Значение сиалидазы (нейраминидазы) ассоциированной с плазматической мембраной для морфофункциональной пластичности нейральных клеток

С.Н. Прошин [1], Е.Р. Бычков [2], А.А. Лебедев [3], Е.В. Каминская [4], П.Д. Шабанов [3]

[1] ФГУЗ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова» МЧС России, Санкт–Петербург

[2] Отдел фармакологии, Медицинский центр университета Вандербилта, Нашвил, США

[3] Военно–медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт–Петербург

[4] Институт цитологии РАН, Санкт–Петербург

Sialidase associated with plasma membrane as a key factor for neural cell plasticity

S.N. Proshin [1], E.R. Bychkov [2], A.A. Lebedev [3], E.V. Kaminskaya [4], P.D. Shabanov [3]

[1] Nikiforov Russian Center for Emergency and Radiation Medicine, Emercom of Russia, St. Petersburg

[2] Department of Pharmacology, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, USA

[3] Military Medical Academy, St. Petersburg

[4] The Institute of Cytology, RAS, St. Petersburg

Культивирование нейральной клеточной линии NB-1 нейробластомы человека с дибутирил-цАМФ приводило как к повышению частоты встречаемости нейронов, которые образовывали отростки, так и к повышению активности сиалидазы, ассоциированной с плазматической мембраной (САПМ), более чем в 2 раза. Повышение активности САПМ также сопровождалось увеличением количества мРНК этого фермента. В нейральных клетках с высокой активностью САПМ и развитыми отростками также регистрировалось достоверное повышение активности маркера биохимической дифференцировки нейральных клеток-ацетилхолинэстеразы. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что повышение активности САПМ связано с дифференцировкой нейральных клеток в культуре и предположить возможность использования этого фермента как потенциальной мишени для терапии заболеваний, связанных с повреждением клеток нейрального происхождения, в том числе — нейронов.

Ключевые слова: сиалидаза, нейраминидаза, ганглиозиды, нейральные клетки.

The treatment of human neuroblastoma NB-1 cells by db-cAMP induced the high frequency of neural cells bearing neurite as well as more than two-fold elevated activity of sialidase associated with plasma membrane (SAPM). The elevated silaidase activity was accompanied by increasing the quantity of mRNA for that enzyme as was estimated by RT-PCR. The neural cells with elevated SAPM activity and developed neurite were shown to have high activity of another enzyme (acetylcholinesterase) that is strongly considered as a biochemical marker of neural cell differentiation. Due to our experimental work it has been reasoned that elevated activity of sialidase associated with plasma membrane is closely related to neural cell differentiation and can be considered as a key factor for therapy of disorders connected with damage of cells of neuronal origin.

Key words: sialidase, neuraminidase, gangliosides, neural cells.

Введение

Содержание ганглиозидов в плазматической мембране находится под контролем не только сиалилтрансфераз, участвующих в синтезе этих гликосфинголипидов, но и сиалидаз (нейраминидаз), отвечающих за их разрушение. К настоящему времени у млекопитающих выявлено, по крайней мере, четыре типа сиалидаз, отличающихся между собой по клеточной компартментализации и специфичности к субстрату [1–3]. Ранее на грызунах (мыши) было показано, что матричная РНК (мРНК) для сиалидазы, связанной (ассоциированной) с плазматической мембраной клетки (САПМ), выявляется в коре головного мозга, мозжечке, (в клетках зернистого слоя и клетках Пуркинье), а также в гиппокампе [4]. Поскольку ганглиозиды обнаруживаются в избыточном количестве в нервной ткани, можно предположить, что активность САПМ имеет значение в формировании пластичности нейронов [5]. Как известно, способность различных отделов центральной нервной системы к реорганизации была бы невозможна без нейропластичности, которая характеризуется способность нейронов изменять свои функции, химические характеристики и/или структуру (морфологию). Контакт нейрональной клетки с факторами внешней среды осуществляется через плазматическую мембрану, и САПМ может являться непосредственным участником событий, происходящих при аксоногенезе. Образование аксона нейрональной клеткой сопровождается асимметричным перераспределением определённых молекул в плазматической мембране, т.е. поляризацией нейрона [6]. Считается, что активность САПМ приводит к изменению содержания в плазматической мембране высших ганглиозидов и накоплению ганглиозидов с одной молекулой сиаловой кислоты [7]. Ганглиозиды концентрируются в участках плазматической мембраны, получивших название «липидные микродомены», которые также насыщены сигнальными молекулами (киназами) [8]. Получены данные, указывающие, что, изменяя количественный и, главным образом, качественный состав ганглиозидов в микродоменах, САМП способна модулировать активность киназ

e-mail: psn@arcerm.spb.ru

и, следовательно, реакцию клетки на определённые стимулы [9]. Несмотря на многообразие внешних стимулов, которые воздействуют на клетку, многие из них реализуются через ключевые факторы, к которым, без сомнения, относится циклическая АМФ (цАМФ) [10]. Низкий молекулярный вес цАМФ позволяет этой молекуле быстро диффундировать в клетке и регулировать многие внутриклеточные процессы. В частности, происходит активация сигнальных систем, сопряжённых с протеинкиназой А, которая, в свою очередь, проникая в клеточное ядро, подвергает фосфорилированию цАМФ-зависимый транскрипционный фактор (CREB) [11]. САПМ в своей первичной структуре имеет сайт для фосфорилирования протеинкиназой А, что предполагает регуляцию этой сиалидазы через цАМФ-сопряжённые сигнальные системы [12, 13]. Цель настоящего исследования, проведенного на клетках нейральной клеточной линии NB-1 нейробластомы человека, состояла в изучении изменения активности САМП под воздействием цАМФ, что важно для понимания механизма формированния морфофункциональной пластичности нервной ткани и выработки терапевтических подходов к лечению соответствующей патологии.

Материал и методы

В работе использовали нейральную клеточную линию NB-1 нейробластомы человека (Health Science Research Resources Bank), которую выращивали на смеси сред RPMI-1640 (45%) и Игла (45%) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки коров (ЭСК) в пластиковых чашках, покрытых поли-L-лизином (Falkone). Клетки высевали с плотностью, в среднем $1,5\times10^6$ клеток на см^2. Через сутки после начала культивирования, когда плотность роста нейральных клеток достигала 50%, клетки инкубировали либо в полной среде (RPMI-1640, среда Игла и ЭСК), либо в бессывороточной среде в течение 24 ч и 48 ч. В эксперименте в среду добавляли (однократно) синтетический аналог цАМФ – дибутирил цАМФ (дб-цАМФ, Sigma, США) в конечной концентрации 2 мМ (рис. 1). Для контроля проводили культивирование в бессывороточной среде. Через 24 ч и 48 ч на инвертированном фазово-контрастном микроскопе (DIAPHOT-TMD, Nikon) регистрировали отростки нейральных клеток, измеряя длину отростка. В каждом случае измерено не менее 600 клеток. В зависимости от длины отростка все нейральные клетки были подразделены на четыре класса: нейральные клетки с короткими (до 12 мкм) отростками (I класс), средними (12–21 мкм) отростками (II класс), длинными (25–36 мкм) отростками (III класс) и нейральные клетки с отростками более 36 мкм (IV класс) [14]. Для биохимического анализа оценки активности САПМ, лизосомальной сиалидазы (ЛС) и ацетилхолинэстеразы (АХЭ) клетки снимали с поверхности чашек чистым резиновым шпателем и гомогенизировали в охлаждённом фосфатно-солевом буфере (ФСБ, pH 7.0), содержащем 0,5 мМ фенилметансульфонилфлюорид, леупептин (10 мкг/мл) и пепстатин (10 мкг/мл) и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 мин при 4°С. Далее в одной части клеточного гомогената определяли активность САПМ, используя в качестве субстрата смесь ганглиозидов (конечная концентрация 0,5 мг/мл, Sigma) в присутствии 0,1% тритон Х-100. После инкубации в течение 1 ч при 37°С свободные сиаловые кислоты определяли с помощью тиобарбитуровой кислоты (ТБК) и регистрировали продукт реакции (хромофор) при длине волны 549 нм (Victor^2) [15]. Активность САПМ выражали в единицах на мг белка – ед./мг белка.

В другой части клеточного гомогената определяли активность ЛС, используя синтетический субстрат 4-метилумбеллиферил-N-ацетилнейраминовую кислоту (4-МУНАНК) в конечной концентрации 2 мМ. Флуорометрическое измерение продукта реакции 4-умбеллиферона проводили при 450 нм [16]. Активность фермента выражали в единицах на мг белка – ед./мг белка. Активность АХЭ регистрировали по методу Эллмана [17]. Концентрацию белка в клеточном гомогенате определяли по методу Брэдфорд [18].

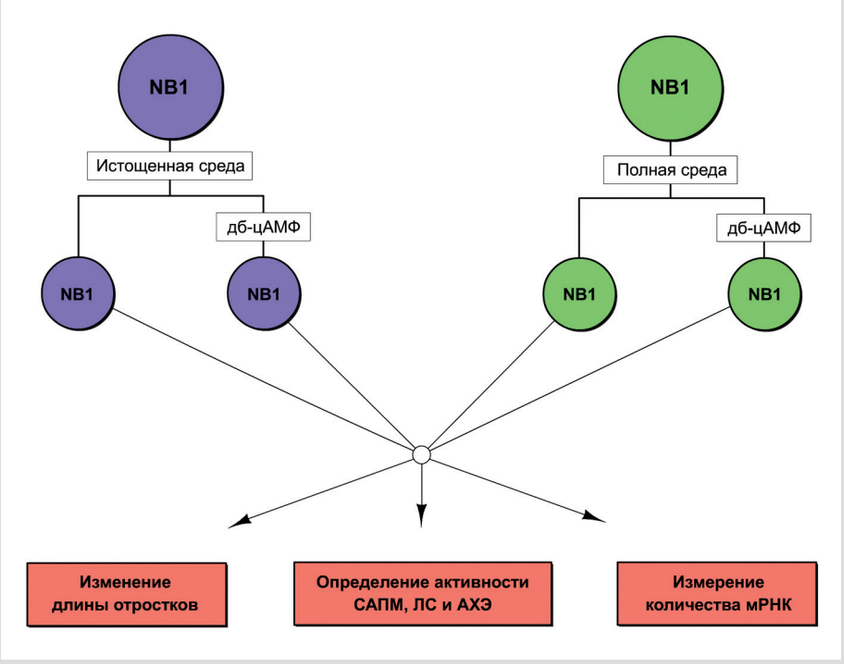

Рис. 1. Схема эксперимента

Для ОТ-ПЦР из культуральных чашек полностью удаляли питательную среду и далее выделяли РНК из клеток с использованием гуанидинтиоционата и фенол-хлороформа согласно протоколу, предложенному ранее [19]. Для получения комплементарной ДНК (кДНК) количество РНК выравнивали, разбавляя РНК в 11 мкл воды высокой степени очистки. К каждой пробе добавляли 1 мкл олиго-Т-праймера. Образцы инкубировали при следующих температурных и временных параметрах амплификатора (Amplicon) до внесения обратной транскриптазы (Superscript II RT): 70°С в течение 10 мин, 3°С в течение 5 мин. Непосредственно перед повышением температуры до 42°С в пробирки вносили по 7 мкл буфера для обратной транскриптазы, смесь нуклеотидов (10 мМ), 0,1 М дитиотрейтола и 1 мкл обратной транскриптазы. Далее инкубацию образцов проводили при 42°С в течение 50 мин. По завершении инкубации образцов при 70°С в течение 15 мин в пробирки добавляли 0,2 мкл РНКазы Н (из расчёта 60 U/мкл) и продолжали инкубацию при 37°С в течение 20 мин. Реакцию останавливали, добавив 480 мкл воды. Условия полимеразной цепной реакции в течение 45 циклов: 94°С – 1 мин, 60°С – 1 мин, 72°С – 2 мин. Прямой праймер: 5'–GACAGAGGGATTACCTACCGGATC-3', нуклеотиды 55–78 от стартового кодона; обратный праймер: 5'–GAGCCATGATTCTGACGGTGTT-3', нуклеотиды 966–987. Образцы нормализовали по уровню экспрессии β-актина [4].

Статистическую обработку данных проводили по *t*-критерию Стьюдента. Полученные результаты являются экспериментами, проводившимися не менее, чем в трёх повторениях.

Результаты

Результаты показывают, что в нейральных клетках, которые инкубировали в полной среде уже через сутки можно было определить спонтанное образование отростков (в отсутствие дб-цАМФ), что было зарегистрировано по сравнению с исходной (0 ч) клеточной культурой (рис. 2, А) в повышении частоты встречаемости нейральных клеток II класса, т.е. клеток, длина отростков которых составляла от 12–24 мкм (рис. 2, C^{24}).

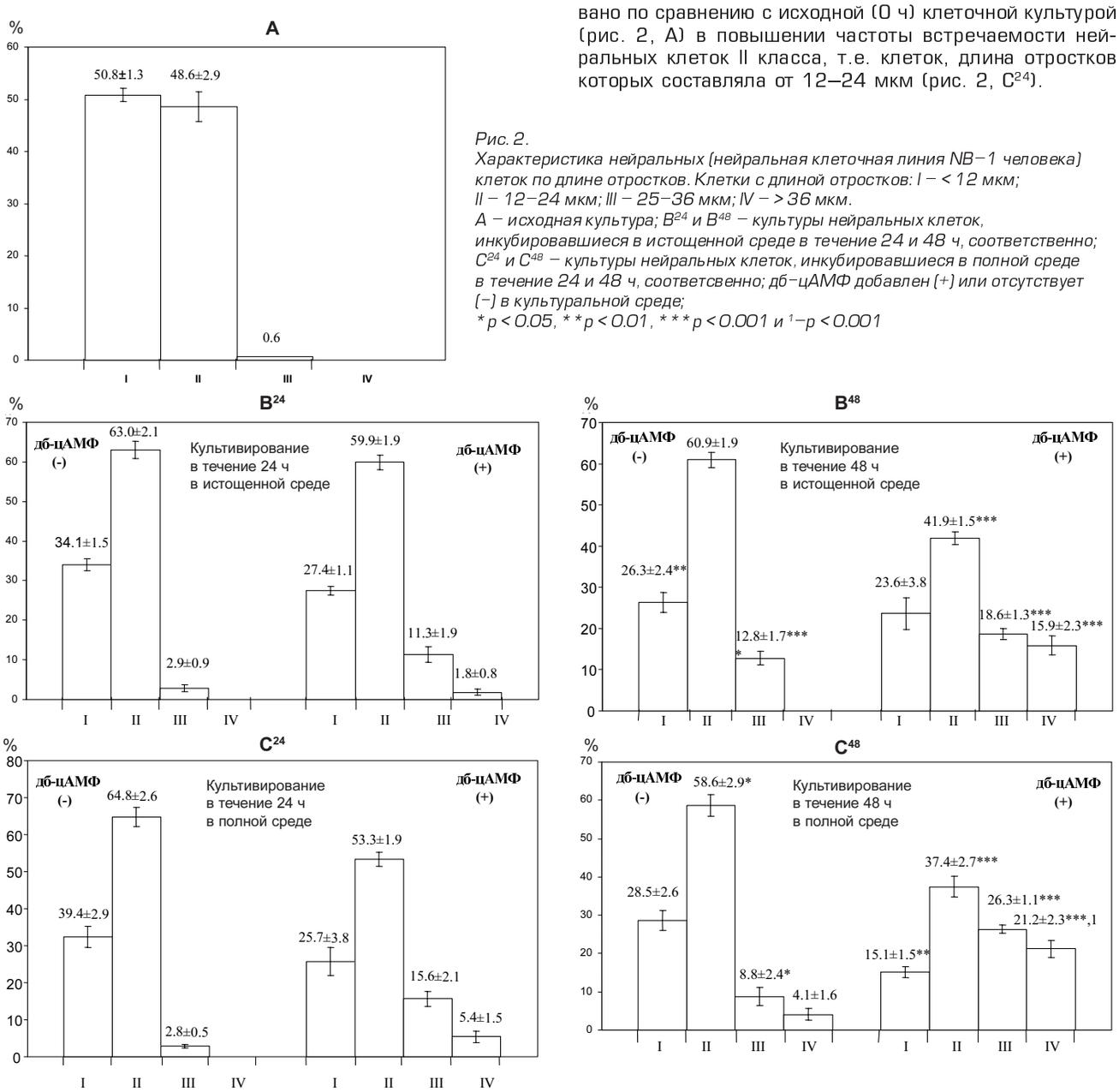

Рис. 2.
Характеристика нейральных (нейральная клеточная линия NB–1 человека) клеток по длине отростков. Клетки с длиной отростков: I – < 12 мкм; II – 12–24 мкм; III – 25–36 мкм; IV – > 36 мкм.
А – исходная культура; B^{24} и B^{48} – культуры нейральных клеток, инкубировавшиеся в истощенной среде в течение 24 и 48 ч, соответственно; C^{24} и C^{48} – культуры нейральных клеток, инкубировавшиеся в полной среде в течение 24 и 48 ч, соответственно; дб–цАМФ добавлен (+) или отсутствует (–) в культуральной среде;
**p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 и [1]–p < 0.001*

В культуре клеток, которые выращивали в течение 24 ч в бессывороточной среде, также было зарегистрировано спонтанное (дб-цАМФ (–)) образование отростков (рис. 2, B^{24}). При этом ни в нейральных клетках, которые культивировали в бессыворотной среде, ни в нейральных клетках, которые инкубировали в полной среде, в отсутствие синтетического аналога цАМФ, частота встречаемости клеток III класса не превышала 3% (длина отростков 25–36 мкм), а клетки с длиной отростков более 36 мкм (IV класс) не были выявлены (рис. 3, А). Напротив, обработка культур дб-цАМФ уже через сутки позволяла зарегистрировать не только достоверное ($p<0,001$) повышение частоты встречаемости нейральных клеток III класса, но и выявлять клетки, длина отростков которых превышала 36 мкм (рис. 3, Б). Инкубирование нейральных клеток в течение 48 ч в полной среде в присутствии дб-цАМФ привело к ещё большему повышению частоты встречаемости клеток, длина отростков которых превышала 36 мкм (рис. 2, C^{48}). Достоверное различие с клетками IV класса, которые культивировали в течение 24 ч (рис. 2, C^{24}) также было выявлено ($p<0,001$). Исследование нейральных клеток, культивируемых в течение 48 ч в бессывороточной среде, но с добавлением дб-цАМФ, позволило выявить достоверные (по сравнению с культурой, инкубировавшейся в течение 24 ч) различия по частоте встречаемости клеток, длина отростков которых составляла менее 24, 25–36 и более 36 мкм при уровне значимости $p<0,001$, $p<0,05$ и $p<0,01$, соответственно (рис. 2, B^{48}). В культуре нейральных клеток, которую инкубировали в течение 48 ч в полной среде, но в отсутствие дб-цАМФ также можно было определить повышение частоты встречаемости клеток III и IV классов (рис. 2, C^{48}). Между культурами нейральных клеток, инкубировавшихся с добавлением или без добавления дб-цАМФ, были выявлены достоверные различия по частоте встречаемости клеток, длина отростков которых превышала 36 мкм (класс IV, $p<0,001$). В культуре клеток, которые инкубировали в течение 48 ч в бессывороточной питательной среде и без добавления синтетического аналога цАМФ, не определялись нейральные клетки IV класса (рис. 2, B^{48}).

Активность САПМ в исходной клеточной культуре (0 ч) составила 4,2±1,6 ед./мг белка (рис. 4).

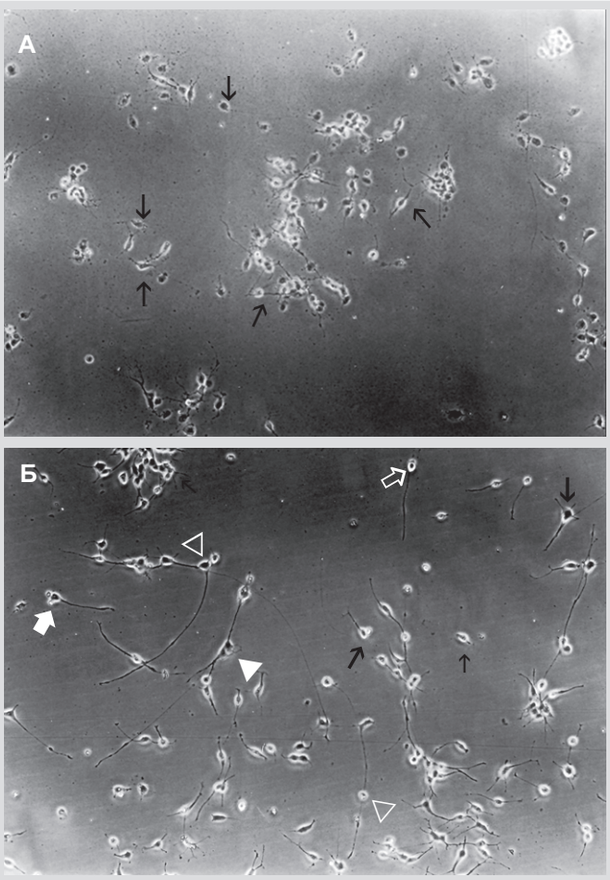

Рис. 3. Образование отростков нейральными клетками kk NB–1 нейробластомы человека без добавления (А) и в присутствии (Б) дибутирил–цАМФ. Нейральные клетки I, II, III и IV классов обозначены тонкими, чёрными (толстыми), белыми (толстыми) и стрелкой–пирамидкой, соответственно

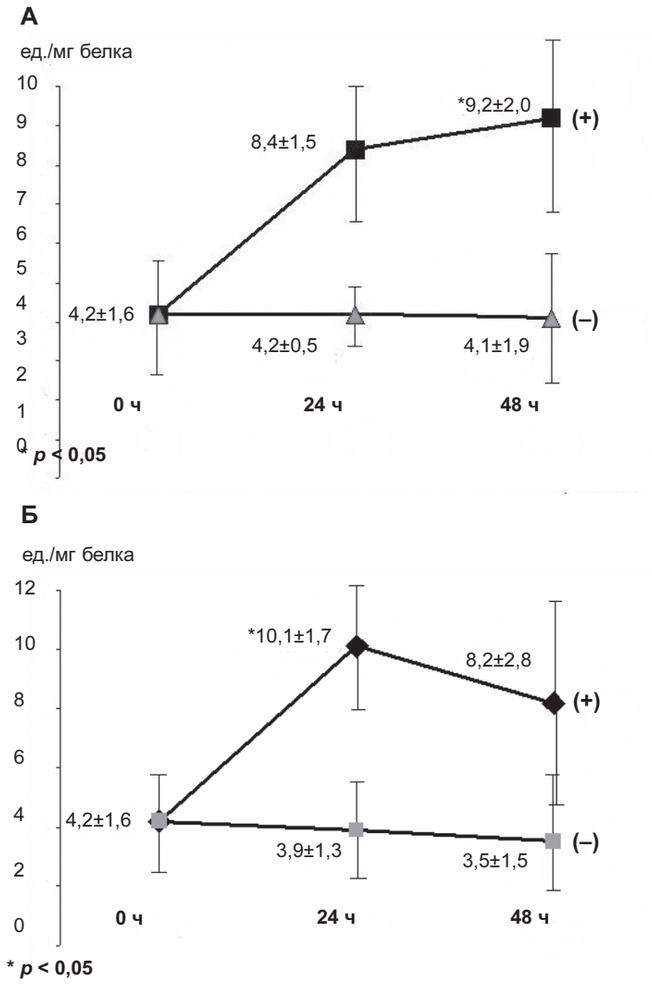

Рис. 4. Активность сиалидазы, связанной с плазматической мембраной в нейральных клетках NB–1 нейробластомы человека при различных экспериментальных условиях. Клетки инкубировались в полной (А) или истощённой (Б) среде в присутствии (+) или без добавления (–) дб–цАМФ

Через сутки в присутствии дб-цАМФ активность САПМ в нейральных клетках, которые культивировали в полной среде, была зарегистрирована на уровне 8,4±1,5 ед./мг белка. Тогда как в клетках, которые культивировали в бессывороточной среде, активность САПМ повысилась более чем в 2 раза как по сравнению с исходной культурой (0 ч), так и по сравнению с активностью САПМ в клетках, культивировавшихся в отсутствии ЭСК и дб-цАМФ (рис. 4, Б) При этом были выявлены достоверные различия ($p<0,05$). На 2-е сут эксперимента активность САПМ в нейральных клетках, культивировавшихся в полной среде, показала тенденцию к возрастанию (9,2±2,0 ед./мг белка) и значимо ($p<0,05$) отличалась от активности САПМ в нейральных клетках культуры, которая не обрабатывалась дб-цАМФ (рис. 4, А). Напротив, активность САПМ в нейральных клетках, культивировавшихся в течение 48 ч в бессыворотной среде и обработанных дб-цАМФ, снизилась до 8,2 ед./мг белка (рис. 4, Б).

Исследование активности ЛС в клетках NB-1 (табл.) не выявило достоверных различий по данному показателю между контрольной клеточной культурой и в эксперименте – при обработке нейральных клеток дб-цАМФ.

Повышение активности САПМ сопровождалось также повышением количества мРНК для этой сиалидазы (рис. 5).

Все нейральные клетки, которые обрабатывались дб-цАМФ, продемонстрировали достоверное ($p<0,001$) повышение количества мРНК (кДНК) по сравнению с контролем и клетками, не обработанными дб-цАМФ (рис. 6).

Следует отметить, что в культурах нейральных клеток, которые были обработаны дб-цАМФ и образовывали длинные отростки, также регистрировалось достоверное повышение активности АХЭ ($p<0,001$) не только по сравнению с контролем, но и по сравнению с нейральными клетками, которые не обрабатывались дб-цАМФ (рис. 7). Поскольку АХЭ является маркером дифференцировки нейральных клеток, можно сделать вывод, что повышение активности сиалидазы (нейраминидазы), ассоциированной с плазматической мембраной, взаимосвязано с образованием отростков при дифференцировке нейральных клеток.

Активность лизосомальной сиалидазы (ед./мг белка) в нейральных клетках линии NB–1 при разных экспериментальных состояниях

Время культивирования (ч)	Культуральная среда			
	полная		истощённая	
	дб-цАМФ		дб-цАМФ	
	–	+	–	+
24	1,011±0,193	0,897±0,206	0,896±0,177	,905±0,097
48	0,856±0,087	1,101±0,156	1,114±0,215	0,931±0,121

Примечание: В исходной клеточной культуре (0 ч) активность лизосомальной сиалидазы составила 0,884±0,139 ед./мг белка.

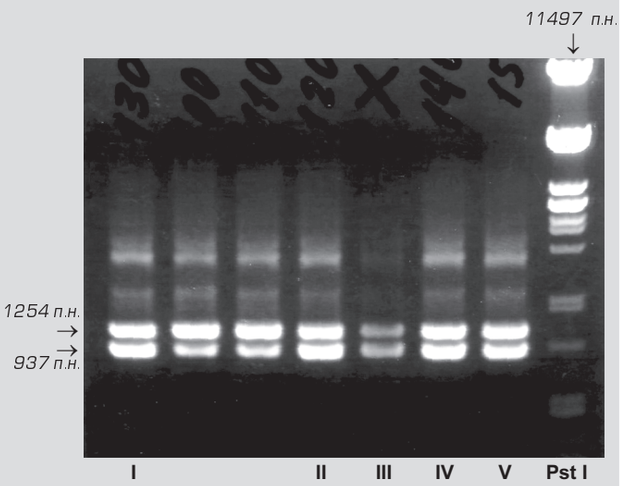

Рис. 5. Количество мРНК гена САПМ, определенное методом ОТ–ПЦР в нейральной клеточной линии NB–1 нейробластомы человека.
I – 400.7 фгр (24 ч, полная среда, + дб–цАМФ);
II – 384.7 фгр (48 ч, полная среда, + дб–цАМФ);
III – 93.5 фгр (контроль);
IV – 387.8 фгр (24 ч, истощённая среда, + дб–АМФ);
V – 368.2 фгр (48 ч, истощённая среда, + дб–цАМФ).
Фгр – фемтограммы.

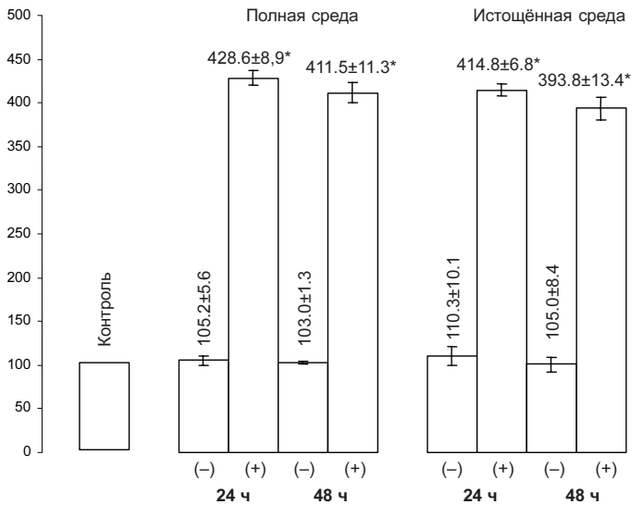

Рис. 6. Количество мРНК (% от контроля) гена сиалидазы, ассоциированной с плазматической мембраной, в нейральной клеточной линии NB–1 нейробластомы человека при разных экспериментальных условиях.
** p<0.001*

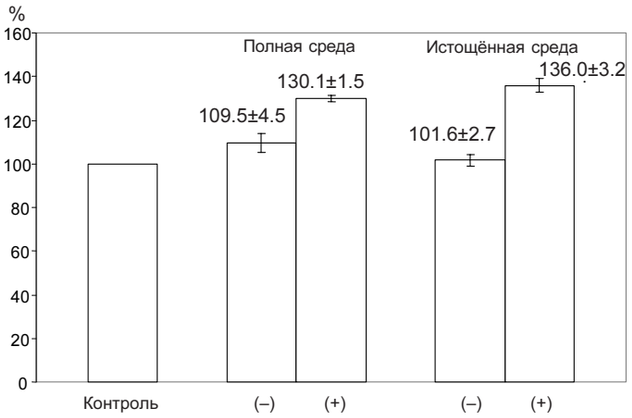

Рис. 7. Активность ацетилхолинэстеразы (в % от контроля) в нейральных клетках NB–1 нейробластомы человека, оцененная через 48 ч инкубации в присутствии (+) или без добавления (–) в среду дб–цАМФ

Обсуждение

Зарегистрированное выраженное образование отростков в нейральной клеточной линии NB-1 нейробластомы человека и повышение активности САПМ согласуется с ранее полученными результатами на других нейральнах клеточных линиях. Так, выраженное образование отростков нейральными клетками Neuro2A нейробластомы мыши также сопровождалось повышением активности САПМ [4]. Образование отростков нейральными клетками нейробластомы мыши было вызвано 5-бромдезоксиуридином (БДУ). При этом уже на 3-и сут эксперимента более чем 44% клеток, обработанных БДУ, образовывали отростки, тогда как в контроле этот показатель составил менее 31%. В нейральных клетках Neuro2A нейробластомы мыши, которые образовывали отростки, также было зарегистрировано достоверное повышение ацетилхолинэстеразной активности. Циклический аденозинмонофосфат является фактором, который вызывает образование отростков не только в исследованной нами нейральной клеточной линии NB-1 нейробластомы человека, но и в ряде других клетках нейрального происхождения. В клеточной линии

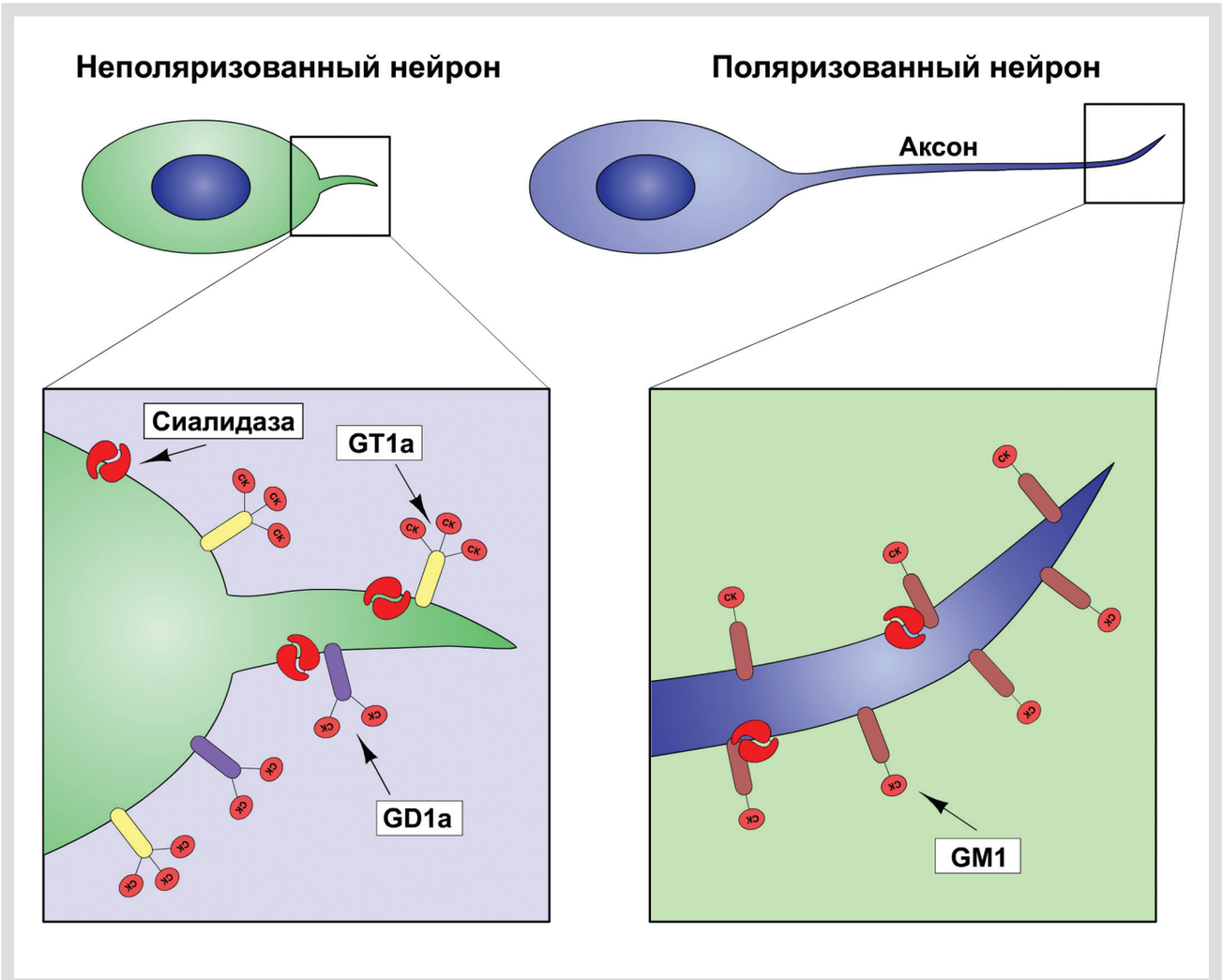

Рис. 8. Предполагаемый механизм индукции аксоногенеза нейронов в результате активации сиалидазы, ассоциированной с плазматической мембраной

NG108-15 после обработки дб-цАМФ также было обнаружено образование отростков [20]. Являясь вторичным мессенджером, цАМФ вовлечён в разнообразные сигнальные каскады внутри клетки. Вместе с тем, принято считать, что именно сопряжённый с протеинкиназой А (А-киназа) сигнальный каскад в клетке регулируется цАМФ [21]. К настоящему времени установлено, что и САПМ, и А-киназа в плазматической мембране клетки компартментализованы в липидных микродоменах [22–24]. Можно предположить, что при обработке нейральных клеток (и, в частности, клеток NB-1 нейробластомы человека) цАМФ (дб-цАМФ) происходит активация А-киназы, которая функционально – через фосфорилирование, воздействует на САПМ, поскольку установлено, что в своей первичной структуре эта сиалидаза имеет участок, который потенциально может быть фосфорилирован А-киназой [11, 12]. САПМ, в свою очередь, активирует факторы, вовлечённые в образование отростков нейральными клетками. Возможно, что САМП, изменяя в результате своей активности количественный и, главным образом, качественный состав ганглиозидов (GM1) в плазматической мембране, вызывает поляризацию нейронов и стимулирует аксоногенез (рис. 8). Таким образом, исходя из представленных данных, можно предположить, что САПМ является потенциальным фактором для регенерации аксонов нейронов. Действительно, при исследовании первичной культуры гиппокампа, выделенного из эмбрионов крыс, было установлено, что повышение активности САПМ имело решающее влияние как на аксоногенез, так и на восстановление перерезанных аксонов [14]. Нейроны гиппокампа, в которых регистрировалась высокая активность САПМ, также формировали более длинные аксоны по сравнению с нейронами, в которых активность САПМ выявлялась на низком (базальном) уровне. При повреждении (перерезке) аксона только те нейроны гиппокампа восстанавливали аксоны, чья сиалидазная активность была высокой.

Таким образом, САМП является не только одним из звеньев в механизме, направленном на формирование пластичности нейральной клетки (нейрона), но и потенциальной терапевтической (фармакологической) мишенью в лечении заболеваний, сопровождающихся повреждением нейронов.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Miyagi T., Wada T., Iwamatsu A. Molecular cloning and characterization of a plasma membrane-associated sialidase specific for gangliosides. J. Biol. Chem. 1999; 274: 5004–11.

2. Yamaguchi K., Hata K., Koseki K. Evidence for mitochondrial localization of a novel human sialidase (NEU4). Biochem. J. 2005; 390(1): 85–93.

3. Proshin S. Sialidase activity and metastatic characteristics of tumor cell clones in vivo of rat rhabdomyosarcoma RA–23. J. Glycobiol. 2007; 17(11): 1228.

4. Hasegawa T., Yamaguchi K., Wada T. et al. Molecular cloning of mouse ganglioside sialidase and its increased expression in Neuro2a cell differentiation. J. Biol. Chem. 2000; 275: 8007–15.

5. Kopitz J., von Reitzenstein C., Mьhl C., Cantz M. Role of plasma membrane ganglioside sialidase of human neuroblastoma cells in growth control and differentiation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1994; 199: 1188–93.

6. Da Silva J.S., Hasegawa T., Miyagi T. Asymmetric membrane ganglioside sialidase activity specifies axonal fate. Nat. Neurosci. 2005; 8(5): 606–15.

7. Kato K., Shiga K., Yamaguchi K. Plasma-membrane-associated sialidase (NEU3) differentially regulates integrin-mediated cell proliferation through laminin- and fibronectin-derived signaling. Biochem. J. 2006; 394(3): 647–56.

8. Wang Y., Yamaguchi K., Wada T. et al. A close association of the ganglioside-specific sialidase Neu3 with caveolin in membrane microdomains. J. Biol. Chem. 2002; 277(29): 26252–9.

9. Odintsova E., Butters T.D., Monti E. Gangliosides play an important role in the organization of CD82-enriched microdomains. Biochem. J. 2006; 400(2): 315-25.

10. Mao L., Wang J.Q. Glutamate cascade to cAMP response-binding protein phosphorylation in cultured striatal neurons through calcium-coupled group I metabotropic glutamate receptors. Mol. Pharmacol. 2002; 62(3): 473–84.

11. Kumar A.P., Bhaskaran S., Ganapathy M. et al. Akt/cAMP-responsive element binding protein/cyclin D1 network: a novel target for prostate cancer inhibition in transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model mediated by nexrutine, a phellodendron amurensen bark extract. Clin. Cancer Res. 2007; 13(9): 2784–94.

12. Palestini P., Pitto M., Ferraretto A. et al. Change of ganglioside accessibility at the plasma membrane surface of cultured neurons, following protein kinase C activation. Biochemistry. 1998; 37: 3143–8.

13. Hata K., Sasaki A., Sawada M. et al. Overexpression of ganglioside sialidase in transgenic mice leads to non-insulin dependent diabetes mellitus. Glycoconj. J. 2001; 18: 90–4.

14. Rodriguez J.A., Piddini E., Hasegawa T. et al. Plasma membrane ganglioside regulates axonal growth and regeneration in hippocampal neurons in culture. J. Neurosci. 2001; 21(21): 8387–95.

15. Warren L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. J. Biol. Chem. 1959; 234(8): 1971–5.

16. Miyagi T., Tsuiki S. Rat-liver lysosomal sialidase. Solubilization, substrate specificity and comparison with the cytosolic sialidase. Europ. J. Biochem. 1984; 141: 75–81.

17. Ellman G., Courtney K.D., Andres V. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 1961; 7: 88–95.

18. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976; 72: 248–54.

19. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinum thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction. Anal. Biochem. 1987; 162: 156–9.

20.Kozireski-Chuback D., Wu G., Ledeen R.W. Up–regulation of nuclear GM1 accompanies axon-like, but not dendrite-like, outgrowth in NG108-15 cells. J. Neurosci. Res. 1999; 55: 107–18.

21. Shelly M., Cancedda L., Heilshorn S., Sumbre G., Poo M.M. LKB1/STRAD promotes axon initiation during neuronal polarization. Cell. 2007; 129(3): 565–77.

22. Kalka D., von Reitzenstein C., Kopitz J., Cantz M. The plasma membrane ganglioside silaidase cofractionates with markers of lipid rafts. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001; 283: 989–93.

23. Razani B., Rubin C.S., Lisanti M.P. Regulation of cAMP-mediated signal transduction via interaction of caveolins with the catalytic subunit of protein kinase A. J. Biol. Chem. 1999; 274: 26353–60.

24. Razani B., Lisanti M.P. Two distinct caveolin-1 domains mediate the functional interaction of caveolin-1 with protein kinase A. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2001; 281: C1241–50.

Поступила 14.12.2008