

ТРАНСЛОКАЦІЇ ГІПОКАЛЬЦИНУ, ЩО ВИКЛИКАНІ АКТИВАЦІЄЮ ГЛУТАМАТНИХ РЕЦЕПТОРІВ

Ю. І. Іванова^{1,2, a}, І. М. Карпенко^{1,2}

¹Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут»

²Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України

Анотація

В даній роботі показана роль глутаматних рецепторів різних типів при транслокаціях гіпокальцину, що викликані позаклітинною стимуляцією у шипиках, дендритах та сомі нейронів гіпокампу.

Ключові слова: гіпокальцин, глутаматний рецептор, жовтий флуоресцентний білок, гіпокамп.

Скорочення термінів

HPCA – гіпокальцин;
sAHP – Slow After Hyperpolarisation – довготривала кальційзалежна постгіперполяризація;
YFP – жовтий флуоресцентний білок (yellow fluorescent protein);
CFP – ціановий флуоресцентний білок (cyan fluorescent protein);
NMDA – N-метил-D-аспартат (N-methyl-D-aspartate).

Вступ

Дана робота присвячена дослідженню функціонування такого кальційчутливого сенсорного білка, як гіпокальцин. Цей білок привернув увагу внаслідок його залучення в широкий спектр фізіологічних процесів у нервовій системі. Наприклад, у нокаутних по гіпокальцину мишей, у нейронах яких не експресується гіпокальцин, спостерігалися серйозні порушення просторової та робочої асоціативної пам'яті [1]. У гіпокампальних нейронах гіпокальцин є ключовим посередником між входом Ca^{2+} після групи потенціалів дії, і активацією калієвих каналів, що опосередковують струм повільної гіперполяризації (sAHP), а це в свою чергу регулює пачкову активність нейронів [3]. Гіпокальцин також бере участь у регуляції експресії генів [1], а також є важливим для багатьох процесів, протидіючих кальційіндукованій смерті нейронів [2].

За останній час з використанням методів молекулярної біології (зокрема, нокаута або нокдауна відповідних генів) отримано велику кількість даних щодо фізіологічних функцій різних кальційчутливих білків, в тому числі і гіпокальцину [4]. Але при цьому мало уваги приділялося тому, яким чином кальційчутливі білки регулюються кальцієвими сигналами, що виникають з різних джерел і призводять до абсолютно різних фізіологічних процесів у клітині.

Мета роботи

Визначити роль активації глутаматних рецепторів і потенціалкерованих кальцієвих каналів різних типів у кальцій залежній сигналізації гіпокальцину в дендритах нейронів гіпокампа щурів.

1. Матеріали та методи

1.1. Культивування нейронів гіпокампа щурів.

Гіпокамп від новонароджених щурів був ферментативно дисоційований з використанням 0,05 відсотків пронази. Суспензія клітин з початковою щільністю $3 - 5 \times 10^5$ клітин/см² була нанесена на скельця для культивування, вкриті ламініном і полі-L-орнітином. Культуральне середовище складалося з MEM (Minimal Essential Medium), 0,6 % глюкози, 1 мМ аміду альфааміноглутарової кислоти, 26 мМ NaHCO_3 , 10 мкг/мл інсуліну та 10 відсотків кінської сироватки. Усі культури використовувалося для експериментів після 14 діб інкубації (у більшості експериментів 14 – 19).

1.2. Плазмідні

Гіпокальцин з нарощеним Жовтим Флуоресцентним Протеїном (HPCA-YFP), і синій флуоресцентний білок (CFP) – приєднаний до NCS-1 (NCS – 1 – CFP)

1.3. Трансфекція культури нейронів гіпокампа щурів.

Нейрони були трансфіковані після 5 – 9 днів у культурі. Було використано метод ДНК – фосфат кальцій приципітації, як описано постачальником та метод Ліпофекції. Всі культури використовувалися для експериментів після 2 – 5 днів після трансфекції. Успіх трансфекції складав від 5 до 30 відсотків залежно від DIV.

^ajulia1001@i.ua

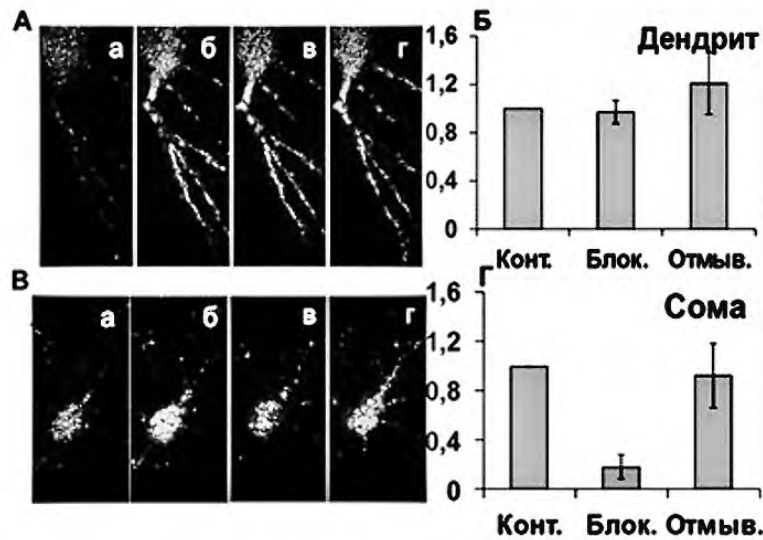


Рис. 1. Вплив блокування вивільнення іонів кальція з ендоплазми – транслокації гіпокальцина в дендриті у відповідь на аплікацію глутамату в контролі, при додаванні СРА і після відмивання, відповідно, Б – нормовані амплітуди транслокацій гіпокальцина у відповідь на аплікацію глутамату у контролі та при додаванні СРА (5 клітин); В, Г-те ж, що і на А, Б – але для транслокацій гіпокальцина в сомі при локальній аплікації глутамату на сому (5 клітин) матичного ретикулума на транслокації гіпокальцина А (б, в, г)

1.4. Ліпофекція

Ліпофекція – це ліпід-посередкована технологія трансфекції, що належить класу біохімічних методів, яка використовує полімери. Також використовується DEAE декстран та фосфат кальцію. Основними перевагами ліпофекції є висока ефективність, здатність трансфікувати всі типи нуклеїнових кислот в широкому діапазоні клітинних типів, простота у використанні, можливість повторювати процедури та низька токсичність. Також зазначимо, що цей метод придатний для багатьох задач трансфекції, та має високі показники ефективності.

1.5. Електрофізіологічна реєстрація

Гіпокампальні нейрони спостерігали інвертованим мікроскопом (40× кратний об'єктив, Axiovert, Zeiss, Німеччина). Струми через мембрану нейронів реєстрували з використанням метода patch-clamp в конфігурації «ціла клітина» за допомогою підсилювача НЕКА ЕРС10/ (НЕКА, Німеччина). Опір доступу становив 10 – 20 МОм. Для активації потенціалкерованих кальцієвих каналів використовували деполяризацію мембрани клітини до +30 мВ або стимуляцію пачкою, що складалася з 10 – 100 потенціалів дії (один потенціал дії викликався поштовхом струму амплітудою 1 нА і тривалістю 3 – 5 мс).

2. Результати дослідження

Досить високий рівень експресії гіпокальцина в нейронах первинної культури гіпокампу щурів починає спостерігатися на 4 – 6 день культивування [4]. Істотна спонтанна мережева електрична активність в культурі нейронів гіпокампу щурів спостерігалася нами починаючи з 6 – 8 дня культивування, NMDAR-опосередковані струми з 10 – 12 дня. Таким чином,

використані нами для експериментів гіпокампальні нейрони (14 – 19 днів після початку культивування) повинні експресувати до цього терміну як необхідна кількість гіпокальцина, так і інші білки та фосfolіпиди, що беруть участь у гіпокальцин-опосередкованих сигнальних процесах. Метою наступних дослідів було з'ясувати, чи може активація глутаматних рецепторів безпосередньо призводити до транслокацій гіпокальцину і чи відіграють якусь роль при цьому метаботропні глутаматні рецептори. Іонофоретична аплікація глутамату призводила до транслокацій гіпокальцину в дендриті. В умовах аплікації у присутності блокаторів іонотропних глутаматних рецепторів CNQX і DL-APV істотного перерозподілу гіпокальцина в дендриті не спостерігалось. Даний факт свідчить про те, що транслокації гіпокальцину при аплікації глутамату відбуваються виключно за рахунок іонотропних глутаматних рецепторів, а активація одних лише метаботропних глутаматних рецепторів не призводить до транслокацій. Іонофорез глутамату можна використовувати для дослідження ролі внутрішньоклітинних депо в транслокаціях гіпокальцину. У присутності СРА (циклопіазонової кислоти – селективного блокатора ретикулярної Са-АТФази) транслокації гіпокальцину в сомі повністю зникали; при цьому в дендриті амплітуда транслокацій залишалася незмінною (рис. 1). Тому можна дійти висновку, що вивільнення кальцію з ретикулума істотно не впливають на транслокації гіпокальцину в дендриті, при тому, що в сомі такі вивільнення являють собою головне джерело іонів кальцію, що забезпечує транслокації. Є два можливих пояснення цьому факту – це може бути пов'язано з різним співвідношенням площа/об'єм для дендрита і сом, з відносно малим об'ємом ретикулярних утворень в дендриті.

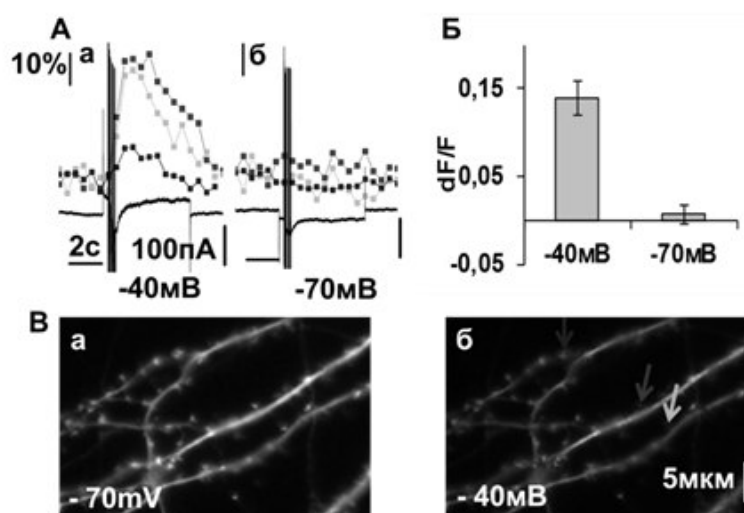


Рис. 2. Транслокації в ши́пику відбуваються за рахунок входу кальцію через синаптичні NMDAR. А-приклади реєстрацій флуоресцентного сигналу гіпокальцину в ши́пику при позаклітинній стимуляції при $V_h = -40$ мВ (а) і -70 мВ (б)-відповідні ши́пики вказані стрілочками на панелі В(б); Б – середні амплітуди транслокацій в ши́пики при позаклітинній стимуляції – $V_h = -40$ мВ і -70 мВ; В – приклади просторового розподілу транслокацій гіпокальцину при $V_h = -40$ мВ (б) і -70 мВ (а)

Транслокації гіпокальцину, що викликані позаклітинною стимуляцією. Для дослідження ролі синаптичних глутаматних рецепторів у транслокаціях гіпокальцину ми використовували позаклітинну стимуляцію аксонів, що підходять до нейрона від інших клітин. У нормальних розчинах стимуляція при підтримуванні на мембрані клітини різниці потенціалів -40 мВ призводила до значних транслокацій гіпокальцину в ши́пики. В той же час така стимуляція не мала ніякого ефекту щодо розподілу гіпокальцину при різниці потенціалів на мембрані -70 мВ (Рис. 2). Відсутність транслокацій гіпокальцину при різниці потенціалів -70 мВ на мембрані клітини свідчить про те, що активація синаптичних кальцієвих AMPAR і метаботропних глутаматних рецепторів (принаймні за відсутності підвищення концентрації кальцію) не відіграє суттєвої ролі в транслокаціях гіпокальцину, викликаних синаптичною активністю. Активація ж синаптичних NMDA-рецепторів призводить до транслокацій гіпокальцину в ши́пики.

Висновки

Активація потенціалкерованих кальцієвих каналів не призводить до транслокації гіпокальцину в ши́пики дендритного дерева, в той же час ініціюючи транслокації гіпокальцину в дендриті. Транслокація гіпокальцину в ши́пики дендритного дерева виникає лише у відповідь на багаторазову активацію синаптичних глутаматних NMDA-рецепторів.

Гіпокальцин транслокує до деяких регіонів нейрону, незважаючи на ізотропне піднесення концентрації кальцію. Це говорить про можливу наявність гіпокальцин-«мішеней». Відповідні дослідження без сумніву є дуже важливими для розуміння як молекулярних механізмів клітинних сигнальних процесів, так і функціонування окремих нейронів і нервової системи в цілому.

Перелік використаних джерел

1. Kobayashi M. et al. Molecular cloning of hippocalcin, a novel calcium-binding protein of the recoverin family exclusively expressed in hippocampus. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1992 — P. 511 — 517.
2. Lindholm D. et al. Neuronal apoptosis inhibitory protein: Structural requirements for hippocalcin binding and effects on survival of NGF-dependent sympathetic neurons. // Biochim. Biophys. — 2002 — P. 138–147.
3. Tzingounis A. V et al. Hippocalcin gates the calcium activation of the slow afterhyperpolarization in hippocampal pyramidal cells. // Neuron. — 2007 — P. 487–493.
4. Palmer C.L. et al. Hippocalcin functions as a calcium sensor in hippocampal LTD. // Neuron. — 2005 — P. 487–494.