

ОСОБЛИВОСТІ ТРАНСЛОКАЦІЙ ГІПОКАЛЬЦИНА ПРИ АКТИВАЦІЇ L- І Т-ТИПІВ ПОТЕНЦІАЛ-КЕРОВАНИХ КАЛЬЦІЄВИХ КАНАЛІВ

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

¹Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут»

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

Анотація

В роботі представлені результати спостережень і порівнянь просторової картини переміщень гіпокальцина під час спонтанної синаптичної активності при різних модельних умовах, а саме, в присутності селективних блокаторів L- і T-типів потенціал-керованих кальцієвих каналів, а також одночасне спостереження переміщень гіпокальцина у відповідь на активацію потенціал-активованих кальцієвих каналів.

Ключові слова: транслокація гіпокальцина, L- і T-тип потенціал-керованих кальцієвих канали, транз'єнт

Вступ

Під час тривалої стимуляції потенціалами дії, коли швидкість виведення кальцію стає порівнянною зі швидкістю входу кальцію, амплітуда кальцієвого транз'єнта не відображає загальну кількість увійшовших в нейрон кальція. Крім того, наявність нелінійних кальцієвих буферів також може призводити до неможливості визначити з амплітуди кальцієвого транз'єнта загальну кількість увійшовшого у відповідь на стимуляцію кальцію.

Гіпокальцин є не тільки кальцієвим сенсором, а й основним кальцієвим буфером в нейронах гіпокампу і тому кількість активованого гіпокальцина пов'язано в першу чергу не з концентрацією вільного кальцію, а із загальною кількістю увійшовшого в нейрон кальцію, особливо якщо врахувати, що вбудовування пов'язаного з кальцієм гіпокальцина в мембрану цілком може стабілізувати зв'язану форму [1]. Тому і необхідно знати не тільки як активація і транслокації гіпокальцина пов'язані з концентрацією вільного кальцію, але і як вони пов'язані і з загальною кількістю увійшовшого кальцію [2, 4].

1. МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ

1.1. Культура нейронів гіпокампу

Всі процедури в даному дослідженні були схвалені Комітетом захисту тварин Національного Інституту Здоров'я. Нейрони були одержані з новонароджених щурів лінії Вістар віком 0 – 1 день. Суспензія клітин з початковою щільністю $3 - 5 \times 10^5$ клітин на см^2 була нанесена на скло для культивування, покриті ламініном і полі-L-орнітином (Invitrogen, США). Середовище культури складалося з MEM (minimal essential medium), 0.6% глюкози, 1mM аміду альфа-аміноглутарової кислоти, 26 mM NaHCO_3 , 10 мкг/мл інсуліну і 10%-ої сироватки коня. Культура інкубувалась при температурі 37°C та в атмосфері 5% CO_2 протягом 14 – 24 днів.

1.2. Електрофізіологічні методи

Нейрони спостерігалися в $40\times$ об'єктив інвертованого мікроскопа (Axiovert, Zeiss, Німеччина). Для реєстрації струмів методом patch-clamp в конфігурації whole-cell використовувалися підсилювач НЕКА EPC10/2 та програмний продукт PatchMaster (НЕКА, Німеччина). Мікроелектроди витягувалися з опором 3 – 6 МОм зі стандартним внутріелектродним KCl-KGluconate розчином. Всі експерименти проводилися за кімнатної температури. Мембранний потенціал і трансмембранний струм реєструвалися з частотою дискретизації 10 або 20 кГц.

1.3. Флуоресцентні методи

Для візуалізації молекул гіпокальцину в дендритах використовувалася штучна експресія білку з флуоресцентним барвником (GFP, TFP або tagRFP). Циклічні ДНК, що кодують відповідні білкові молекули, доставлялися всередину клітин шляхом ліпofектамінової трансфекції (Lipofectamine 2000, Invitrogen).

Покадрова візуалізація нейронів гіпокампу, трансфікованих флуоресцентними білками, здійснювалась за допомогою системи TILL Photonics wide-field imaging system (TILL Photonics, Німеччина) встановленої на інвертований мікроскоп Olympus IX70 з масляно-імерсійним об'єктивом UAPO/340 ($40\times$, NA 1.35, Olympus, Японія), та програмного забезпечення TILL Photonics Live Acquisition. Різні набори інтерференційних оптичних фільтрів (Chroma 69008), джерело світла – монохроматор Polychrome V (FEI GmbH, TillPhotonics GmbH, Німеччина), CCD камера Imago VGA (PCO GmbH, Німеччина).

2. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У дендриті гіпокампулярних нейронів, виходячи з літературних даних, основний кальцієвий струм при деполяризації мембрани створюють L і T-тип

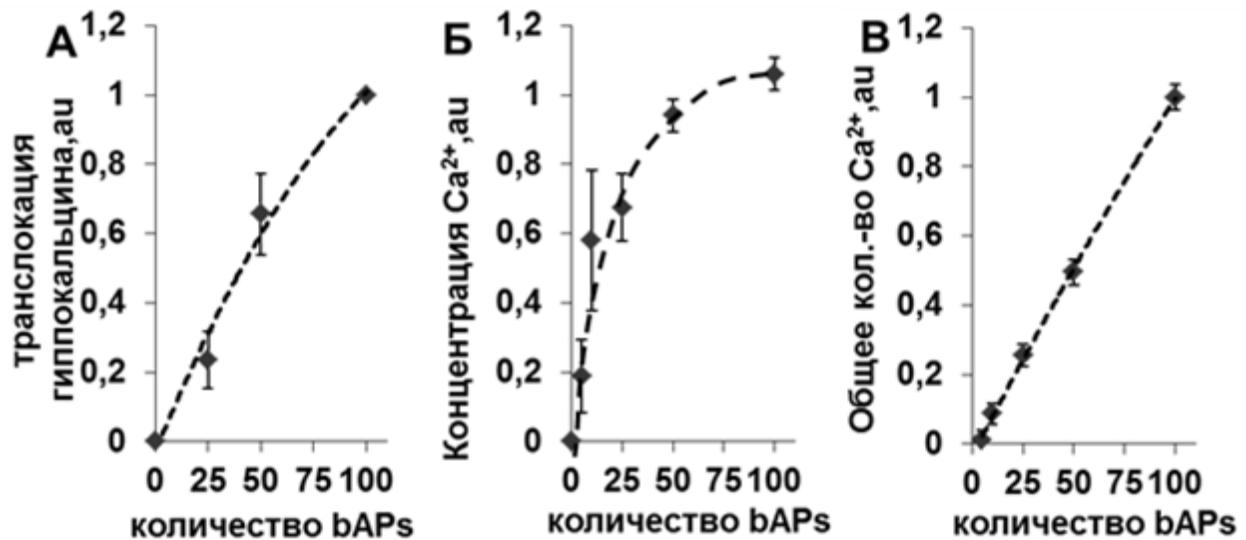


Рис. 1. Транслокації гіпокальцина, зміна концентрації йонів кальцію і загальна кількість йонів кальцію які ввійшли в клітину у відповідь на стимуляцію клітини соматичними потенціалами дії

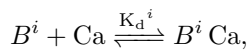
потенціал-керованих кальцієвих каналів [3]. Особливості активації / інактивації цих двох типів каналів призводять до того, що внесок Т-типу в кальцієвом струмі переважує при транзиторних стимуляційних протоколах, наприклад, при стимулюванні нейрона пачкою потенціалів дії, а практично немає ініактивності L-тип – при тривалих деполяризаціях, під час яких канали Т-типу виявляються інактивовані; зокрема, нами спостерігалось практично повне блокування мібефразидом, блокатором Т-типу кальцієвих каналів, транслокації гіпокальцина, викликаних пачкою потенціалів дії, і німодипіном, блокатором L-типу кальцієвих каналів, транслокації, викликаних тривалою деполяризацією (не показано тут). Для того щоб мати повну картину того, як зміна мембранного потенціалу перетворюється в концентрацію гіпокальцина на мембрані, нам необхідно отримати залежність транзиторного типу. У нашій роботі ми використовували потенціали дії як найбільш фізіологічно часто зустрічаємий тип транзиторної активності в нейроні. На рис. 1А представлена отримана нами залежність нормованої транслокації гіпокальцина від кількості потенціалів дії. Дивно, але залежність транслокації гіпокальцина від потенціалів дії була далеко від насичення і при пачці в 100 потенціалів дії, що більше, ніж будь-які спостерігаємі нами в експериментах пачки під час спонтанної мережевої електричної активності в нейронах.

Для повноти картини, ми провели серію дослідів з реєстраціями кальцієвих транзєнтів під час подібних стимуляцій пачками потенціалів дії; в даному випадку концентрація кальцію виконує роль посередника між електричною активністю на мембрані нейрона і вбудовуванні гіпокальцина в мембрану. На наш подив, залежність амплітуди кальцієвого транзєнта від кількості потенціалів дії мала зовсім інший вигляд, ніж залежність сумарної транслокації гіпокальцина від потенціалів дії (рис. 1Б) При 75 – 100 потенціалах дії амплітуда кальцієвого транзєнта починала виходити в насичення, у той час як у перерозподілу гіпокальцина спостерігався ще відносно лінійна ділянка. Можливим поясненням такої різниці у вигляді залежності для транслокації гіпокальцина і амплітуди зміни вільної концентрації кальцію в цитозолі від кількості потенціалів дії може служити те, що концентрація гіпокальцина в гіпокампальних нейронах, виходячи з літературних даних, може становити десятки мкМ, що робить його претендентом на роль основного кальцієвого буфера в гіпокампальних нейронах. В такому випадку, максимальна активація гіпокальцина при вході кальцію буде визначатися швидше загальною кількістю увійшовших в нейрон кальцію, а не максимальною концентрацією вільних йонів кальцію. Ми побудували залежність загальної кількості увійшовшого до нейрону кальцію від кількості потенціалів дії (рис. 1В). В якості заходів для загальної кількості увійшовшого кальцію ми використовували інтеграл по всьому кальцієвому транзєнту. Як видно з представлених графіків, залежність амплітуди транслокації гіпокальцина від кількості потенціалів дії відповідає тій ситуації, коли вбудовування гіпокальцина в мембрану визначається скоріше загальною кількістю увійшовшого на стимуляцію в клітину кальцію, а не концентрацією вільних йонів кальцію в цитозолі.

Цікавим питанням, відповідь на яке дозволяє прояснити особливості функціонування гіпокальцина як кальцієвого сенсора і буфера, є залежність, що спостерігається для амплітуди кальцієвого транзєнта і його інтеграла від кількості стимулів і співвідношення цієї характеристики зі залежністю, що спостерігається при перерозподілі гіпокальцина від кількості потенціалів дії [1] [2]. Амплітуда кальцієвого транзєнта практично досягає насичення при 50 потенціалах дії, але при цьому інтеграл кальцієвого транзєнта ще дуже далекий від насичення.

Цікавим питанням, відповідь на яке дозволяє прояснити особливості функціонування гіпокальцина як кальцієвого сенсора і буфера, є залежність, що спостерігається для амплітуди кальцієвого транзєнта і його інтеграла від кількості стимулів і співвідношення цієї характеристики зі залежністю, що спостерігається при перерозподілі гіпокальцина від кількості потенціалів дії [1] [2]. Амплітуда кальцієвого транзєнта практично досягає насичення при 50 потенціалах дії, але при цьому інтеграл кальцієвого транзєнта ще дуже далекий від насичення.

Таким чином, додатковий вхід кальцію при стимуляції більше 50 потенціалів дії швидше призводить до подовження кальцієвого транзєнта, ніж до збільшення його амплітуди. Така дивна поведінка кальцієвого транзєнта цілком можна пояснити, якщо згадати що гіпокальцин є основним кальцієвим буфером в нейронах гіпокампу. На перший погляд, навіть при наявності декількох буферів, концентрація вільного кальцію в межах динамічного діапазону буферів все одно повинна бути прямо пропорційна загальному увійшов в нейрон кальцію:



де B^i – кальцієвий буфер,

$B^i Ca$ – зв'язаний з кальцієм буфер,

K_d^i – константа зв'язування буфера з йонами кальцію.

Тоді при досить довгих кальцієвих транзєнтів:

$$[B^i Ca] = [B^i] \cdot \frac{[Ca]}{K_d^i},$$

де $[B^i]$ – концентрація кальцієвого буфера,

$[B^i Ca]$ – концентрація зв'язаного з кальцієм буфера,

$[Ca]$ – концентрація вільних йонів кальцію.

У межах динамічного діапазону буферної системи, більша частина йонів кальцію знаходиться у зв'язаному вигляді, тоді

$$\sum_i [B^i Ca] \sim \frac{J_{Ca}}{V}$$

де J_{Ca} – загальна кількість увійшовших йонів кальцію, V – загальний об'єм клітини.

Таким чином, з написаних вище рівнянь отримуємо співвідношення для вільної концентрації кальцію, якій пропорційний флуоресцентний сигнал кальцієвого барвника, який виступає в ролі додаткового кальцієвого буфера:

$$[Ca] \sim \frac{J_{Ca}}{V} \left(\sum_i \frac{[B^i]}{K_d^i} \right)^{-1}.$$

Таким чином, для тривалих кальцієвих транзєнтів концентрація вільного кальцію аж до насичення буферних систем лінійно залежить від загальної

кількості увійшли йонів кальцію. Більш того, при початкову насиченні буферних систем концентрація вільного кальцію починає рости ще швидше.

Можливим поясненням такої поведінки є насичення кальцієвого барвника. Але реєстрований при зв'язуванні з кальцієвим барвником флуоресцентний сигнал вийде в насичення лише при J_{Ca}/V порівнянних з концентрацією кальцієвого барвника, що в таких дослідах складало 200 мкМ. Не на користь цієї гіпотези говорить залежність загальної кількості йонів кальцію в залежності від кількості потенціалів дії (рис. 1В). Якщо б спостерігалось насичення кальцієвого барвника, то таке насичення проявилось б не тільки на залежності амплітуд флуоресцентних транзєнтів від кількості потенціалів дії, але і практично в тому ж інтервалі, що й залежність загальної кількості йонів кальцію від кількості потенціалів дії, чого не спостерігалось в експерименті.

В результаті спостерігається залежності концентрації вільного кальцію (рис. 1А) це виглядає так, ніби з підвищенням концентрації кальцію зростає ефективна буферна ємність системи; ми бачимо нелінійне зростання амплітуди концентрації вільного кальцію в залежності від кількості потенціалів дії і від кількості увійшовшого кальцію.

Перелік використаних джерел

1. Palmer C. L. and Lim W. and Hastie P. G. and Toward M. and Korolchuk V. I. and Burbidge S. A. and Banting G. and Collingridge G. L. and Isaac J. T. and Henley J. M. Hippocalcin functions as a calcium sensor in hippocampal LTD. — 2005. — № 4. — p. 487-494.
2. Bernardo L. and Sabatini B. L. and Thomas G. and Oertner T. G. and Karel Svoboda K. The life cycle of Ca^{2+} ions in dendritic spines. — 2002. — № 3. — p. 439-452.
3. Jin X. and Muntean B. S. and Aal-Aaboda M. S. and Duan Q. and Zhou J. and Nauli S. M. L-type Calcium Channel Modulates Cystic Kidney Phenotype. — 2014. —
4. Kobayashi M. and Takamatsu K. and Saitoh S. and Miura M. and Noguchi T. Molecular cloning of hippocalcin, a novel calcium-binding protein of the recoverin family exclusively expressed in hippocampus. — 1992. — № 1. — p. 511-517.