

І.В. Степанова, П.Г. Костюк, О.П. Костюк

Динамічна взаємодія структур плазматичної мембрани з внутрішньоклітинними кальцієвими депо в нейронах спинномозкових гангліїв

В роботі досліджувался вклад участія ендоплазматического ретикулума і мітохондрій в формування транзєнтів, викликаних деполяризацією плазматическої мембрани в малих (18–24 мкм) нейронах спинномозгових гангліїв крис. Аплікація 10 мкмоль/л мітохондріального протонифора СССР застосовувалась для блокування захопту іонів кальція посередством механізму уніпортера. Для опустошення депо ендоплазматического ретикулума використовувалась преаплікація 1 мкмоль/л блокатора АТФазы ендоплазматического ретикулума – тапсигаргіна. Сравнивались транзєнти, викликані деполяризацією плазмалемми в контрольних умовах і в умовах, коли один з внутріклеточних механізмів (ендоплазматический ретикулум або мітохондрії) не приймає участія в формуванні кальцієвого сигналу. Це дозволило нам визначити кінетику участія мітохондрій і ендоплазматического ретикулума в формуванні кальцієвого сигналу в процесі клітинної активності. Були визначені основні часові характеристики функціонування ендоплазматического ретикулума і мітохондрій при відповіді клітки на стимул. При деполяризації плазматическої мембрани і вході іонів кальція через потенціалуправляемі канали происходить посилення кальцієвого сигналу посередством кальційіндуцированного кальцієвого высвобождения из депо ендоплазматического ретикулума. В то же время мітохондрії обмежують амплітуду транзєнта, викликаного деполяризацією. При цьому мітохондрії і ендоплазматический ретикулум активно взаємодіють між собою – мітохондрії захоплюють кальцій, высвобождаемый из депо ендоплазматического ретикулума, а інгібування уніпортера мітохондрій преаплікацією СССР зменшує амплітуду кофеїніндуцированного транзєнта при його повторній аплікації. Це дозволяє нам передположити можливість высвобождения іонів кальція из депо ендоплазматического ретикулума в відповідь на їх виведення из мітохондрій. Було проведено сравнение кінетики роботи мітохондрій при різних источниках підвищення цитозольної концентрації кальція.

ВСТУП

Кальцій – широко розповсюджений вторинний посередник у клітині. Він прямо або опосередковано залучений у безліч процесів, що модулюють практично всі фізіологічні властивості клітин. Зміна концентрації іонів вільного внутрішньоклітинного кальцію ($[Ca^{2+}]_i$) у збудливих клітинах відіграє важливу роль у їх відповідях на різні зовнішні стимули. Короткочасне підвищення

концентрації іонів кальцію в цитоплазмі під час фізіологічної активності (так званий кальцієвий транзєнт) є універсальним механізмом, що передає сигнал від структур плазматичної мембрани до внутрішньоклітинних структур, запускаючи такі механізми, як вивільнення нейротрансмітера, регуляція збудливості, синаптична пластичність, регуляція генів [1, 3]. В останні роки велика увага зосереджена на вивченні участі різних внутрішньоклітинних органел у гло-

бальних змінах $[Ca^{2+}]_i$ під час фізіологічної активності клітини. Досліджуються функціонування мітохондрій і ендоплазматичного ретикулула в різних типах клітин, а також взаємодія цих органел у період формування кальцієвого сигналу.

Раніше вважалося, що мітохондрії відносно слабо чутливі до фізіологічних значень $[Ca^{2+}]_i$. Таким чином, підвищення цього показника до 500 нмоль/л – 1 мкмоль/л при введенні інозитолтрифосфату або ріанодину вважалося недостатнім для активації мітохондріального уніпортеру – механізму, за допомогою якого мітохондрії захоплюють Ca^{2+} . Однак нові методики безпосереднього вимірювання концентрації іонів кальцію в мітохондріальному матриксі ізольованих клітин продемонстрували її збільшення, що відбувається одночасно з підвищенням $[Ca^{2+}]_i$ [8, 10, 11]. Причому практично в усіх досліджених клітинах було виявлено, що швидкість захоплення та кількість іонів, які надходять до мітохондрій, залежать не тільки від амплітуди транзйентного підвищення $[Ca^{2+}]_i$, але і від джерел надходження Ca^{2+} і механізмів, завдяки яким відбулося це підвищення [14]. Швидке збільшення концентрації Ca^{2+} в мітохондріальному матриксі може відбуватися за допомогою як іонів кальцію, вивільнених з внутрішньоклітинних кальцієвих депо, так і їх входом з позаклітинного середовища, або, залежно від типу клітин, обома цими механізмами.

Ендоплазматичний ретикулум є універсальною сигнальною органелою, що регулює широкий спектр функціональних клітинних відповідей. Зокрема, вивільнення кальцію з депо ендоплазматичного ретикулула лежить в основі посилення кальцієвого сигналу, зумовленого входом Ca^{2+} через потенціалкеровані кальцієві канали [2, 4].

Ендоплазматичний ретикулум і мітохондрії беруть активну участь у кальцієвій сигналізації, тому механізм їхньої взаємодії представляє великий інтерес. Метою нашої

роботи була кількісна оцінка участі мітохондрій і ендоплазматичного ретикулула у формуванні амплітуди та кінетики кальцієвого сигналу, викликаного деполяризацією плазматичної мембрани в нейронах спинномозкових гангліїв малого діаметра (ноцицептивних) 21-добових щурів, а також вивчення взаємодії вищезгаданих органел у процесі клітинної активності.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили на гостроізолюваних нейронах спинномозкових гангліїв щурів. Нейрони ізольовали за допомогою ферментативної обробки в сольовому розчині Тіроде з додаванням 1 мг/мл колагенази (тип IV, „Sigma”, США) та 2 мг/мл протеїнази (тип XXIII, „Sigma”, США) [15]. Концентрацію цитозольного кальцію в нейронах вимірювали за допомогою кальційчутливого флуоресцентного барвника Indo-1/AM („Sigma”, США). Введення флуоресцентного індикатора в цитозоль відбувалося за допомогою методу інкубації клітин у розчині Тіроде, який містив 10 мкмоль/л Indo-1/AM та 0,02 % Pluronic F-127 (“Molecular Probes Inc.”, США). Для проведення вимірів чашки Петрі з клітинами поміщали в експериментальну камеру, установлену на станині інвертованого флуоресцентного мікроскопа, оснащеного водоімерсійним об’єктивом (x40), і постійно перфузували. Записи кальцієвих транзйентів здійснювали за допомогою програмного забезпечення Тіда (Tida software, “Batelle”, Німеччина). Значення $[Ca^{2+}]_i$ обчислювали за допомогою рівняння Грінкевича [5].

Базовим позаклітинним розчином, що використовували для перфузії експериментальної камери та приготування всіх інших позаклітинних розчинів, був модифікований розчин Тіроде наступного складу (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 2, $MgCl_2$ – 2, $CaCl_2$ – 2, HEPES – 10, глюкоза – 10; pH 7,35.

Для отримання розчину з підвищеним вмістом калію іони натрію ізотонічно заміщали іонами калію. Усі результати досліджень наводили у вигляді середнього значення \pm середньоквадратичне відхилення. Достовірність статистичних відмінностей для двох груп результатів експериментів визначали за допомогою критерію *t* Стьюдента. Достовірними вважалися значення при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ

Проведені нами дослідження показали, що зміна функціонування внутрішньоклітинних кальцієвих депо у нейронах спинномозкових гангліїв малого діаметра від 18 до 24 мкм (ендоплазматичного ретикулума і мітохондрій) призводить до істотних змін амплітуди та кінетики кальцієвих сигналів, викликаних деполяризацією плазматичної мембрани. Ми досліджували вплив уніпортеру мітохондрій і ріанодинового рецептора ендоплазматичного ретикулума на амплітуду та кінетику кальцієвої відповіді клітин, яка виникає при їх стимуляції.

У контролі середнє значення $[Ca^{2+}]_i$ у нейронах становило $118 \text{ нмоль/л} \pm 9 \text{ нмоль/л}$ ($n=11$). Значення максимальної амплітуди кальцієвих сигналів, викликаних трисекундною деполяризацією плазматичної мембрани гіперкалієвим розчином було $377 \text{ нмоль/л} \pm 21 \text{ нмоль/л}$ ($n=11$). Кальцієвий транзєнт при цьому мав фазу швидкого наростання ($3,7 \text{ с} \pm 0,4 \text{ с}$) і фазу спаду, що складається з фази швидкого спаду ($10,0 \text{ с} \pm 1,1 \text{ с}$) і фази плато ($236 \text{ с} \pm 24 \text{ с}$). Стабілізація $[Ca^{2+}]_i$ відбувалася на 230–270-й секунді після початку деполяризації нейрона.

Для оцінки участі ендоплазматичного ретикулума у формуванні транзєнтного підвищення концентрації Ca^{2+} в цитозолі, деполяризацію плазматичної мембрани здійснювали після преаплікації 1 мкмоль/л тапсигаргіну – блокатора Ca^{2+} -АТФази ендоплазматичного ретикулума. Амплітуда

кальцієвого сигналу в цьому разі знижувалася до $246 \text{ нмоль/л} \pm 7 \text{ нмоль/л}$ ($n=8$), у відсотковому співвідношенні зниження амплітуди становило 35% порівняно з контрольними умовами (рис. 1,а). Аналогічні результати було отримано при преаплікації 200 нмоль/л іономіцину, що спустошує ендоплазматичний ретикулум за незалежним від рецепторів механізмом. Таким чином, ендоплазматичний ретикулум значно підсилює кальцієвий сигнал, який надходить від потенціалкерованих каналів плазмолемі.

Для оцінки участі уніпортеру мітохондрій у кальцієвій сигналізації деполаризація плазматичної мембрани здійснювалася на фоні преаплікації 10 мкмоль/л СССР (carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazine), мітохондріального протонофора, що роз'єднує протонний градієнт на внутрішній мембрані мітохондрій. Амплітуда кальцієвих сигналів, викликаних у такий спосіб, сягала $525 \text{ нмоль/л} \pm 14 \text{ нмоль/л}$ ($n=8$), збільшившись відносно контрольних умов на 39% . Істотно змінилася і кінетика транзєнта. Тривалість фази наростання підвищилася порівняно з контрольними умовами в чотири рази і становила $15,8 \text{ с} \pm 1,3 \text{ с}$, а фаза спаду втратила плато і стала однокомпонентною з тривалістю $24,6 \text{ с} \pm 2,1 \text{ с}$ (рис. 1,б). Отримані результати дозволяють зробити висновок про те, що мітохондрії обмежують амплітуду кальцієвого сигналу, викликаного деполяризацією, активно захоплюючи кальцій, котрий надходить до цитозоля через потенціалкеровані кальцієві канали. Концентрація Ca^{2+} у мітохондріях збільшується під час наростання й більшою мірою під час фази швидкого спаду транзєнта. Фаза плато зумовлена виведенням Ca^{2+} з мітохондрій назад у цитозоль.

Для більш детального аналізу участі внутрішньоклітинних органел у кальцієвому гомеостазі було проведено математичну обробку отриманих результатів. На рис. 2

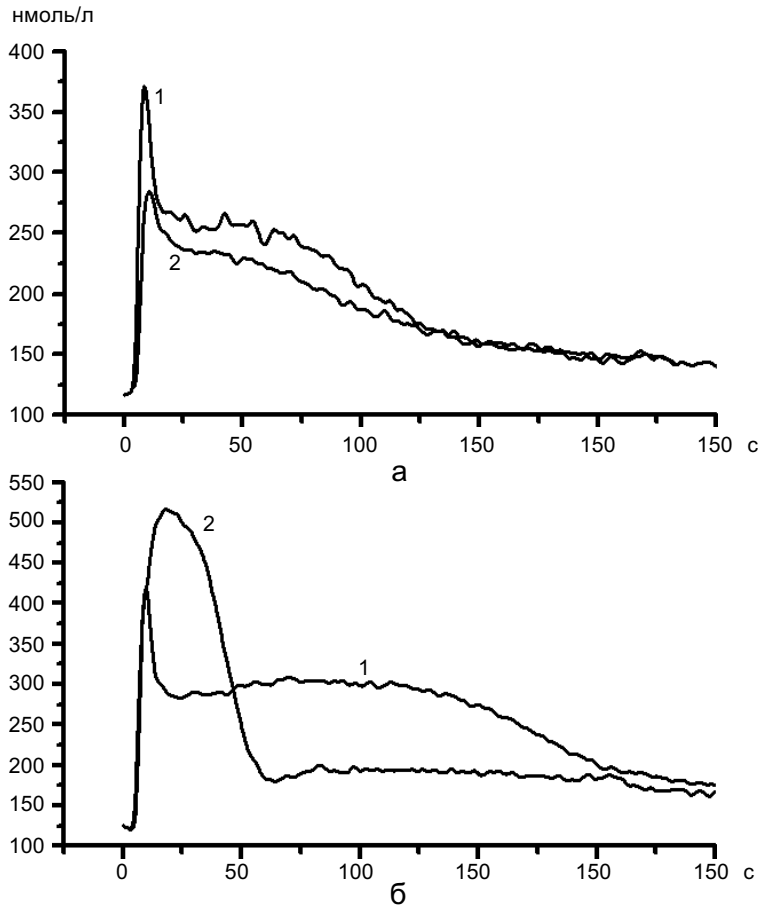


Рис. 1. Зміна внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} , викликана аплікацією гіперкалієвого розчину в контрольних умовах (1) і після преаплікації різних речовин (2): а – тапсигаргін, б – CCCP

показано криві, які характеризують зміни амплітуди та кінетики кальцієвих транзентів, викликані захопленням Ca^{2+} уніпортером мітохондрій і кальційіндукованим вивільненням Ca^{2+} з депо ендоплазматичного ретикулула. Це вивільнення, ініційоване надходженням Ca^{2+} через потенціалкервані кальцієві канали плазматичної мембрани, починалося на 1–3-й секунді і сягало максимуму на 3,8–4,4-й секунді після початку аплікації гіперкалієвого розчину. Потім спостерігалося захоплення іонів кальцію

АТФазою ендоплазматичного ретикулула протягом 6–7 с із цитозоля в люмени, а починаючи з 48–58-ї секунди після початку деполяризації Ca^{2+} знову виводився в цитозоль. Захоплення іонів кальцію мітохондріями починалося з 4–8-ї секунди і сягало максимуму на 14–18-й секунді. Процеси вивільнення Ca^{2+} з мітохондрій починали переважати над процесами захоплення уніпортером на 38–43-й секунді формування кальцієвого сигналу, викликаного деполяризацією. Спільний аналіз кінетики роботи мітохондрій і ендоплазматичного ретикулула дає змогу припустити функціональний зв'язок між цими органелами: іони кальцію, вивільнені з мітохондрій, можливо, викликають кальційіндуковане їх вивільнення з депо ендоплазматичного ретикулула.

У наступній серії експериментів ми вивчали кінетику роботи мітохондрій у разі,

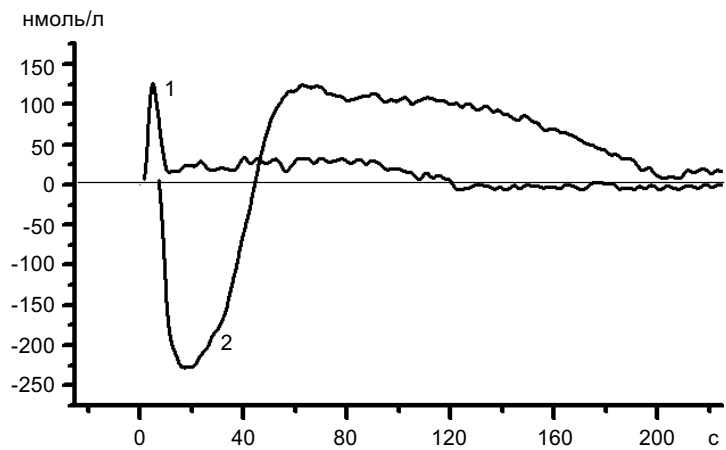


Рис. 2. Зміни амплітуди і кінетики кальцієвого сигналу, викликані кальційіндукованим вивільненням Ca^{2+} з депо ендоплазматичного ретикулула (1) та його захопленням уніпортером мітохондрій (2)

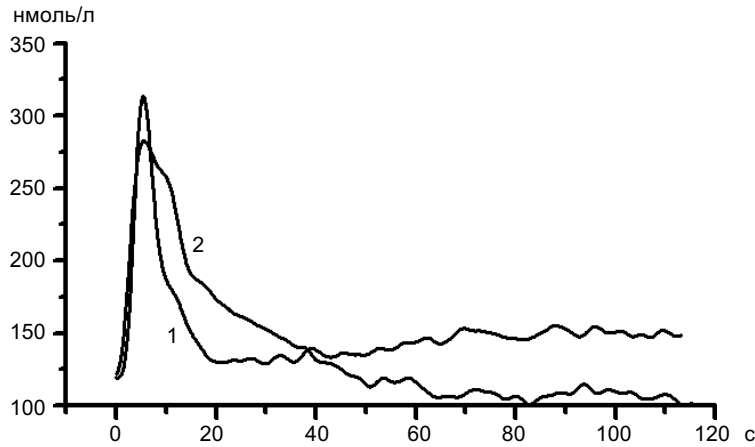


Рис. 3. Кальцієві транзєнти, викликані аплїкацією кофеїну в контрольних умовах (1) та після преаплїкації СССР (2)

коли джерелом Ca^{2+} є ендоплазматичний ретикулум. Вивільнення Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулума у цитозоль викликалося через активацію рїанодинових рецепторів. Для цього використовували позаклітинну аплїкацію 30 ммоль/л кофеїну. Амплїтуда кофеїніндукованих транзєнтів у контрольних умовах становила $295 \text{ нмоль/л} \pm 8 \text{ нмоль/л}$ ($n=12$), після преаплїкації 10 мкмоль/л СССР сягала $217 \text{ нмоль/л} \pm 11 \text{ нмоль/л}$ (рис. 3). Зменшення амплїтуди кофеїніндукованого кальцієвого транзєнта, можливо, пов'язано зі згаданим вище процесом мітохондрїїндукованого кальцієвого вивільнення з ендоплазматичного ретикулума. У відповідь на аплїкацію СССР відбувається виведення Ca^{2+} з мітохондрїї, що у свою чергу може викликати кальцій-їндуковане вивільнення Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулума. Зміна кінетики кофеїніндукованого кальцієвого транзєнта, ймовірно, пов'язана з тим, що в контрольних умовах мітохондрїї активно захоплюють Ca^{2+} , виведений з ендоплазматичного ретикулума. Для підтвердження цього факту, аплїкація СССР відбувалася на різних етапах фази спаду кофеїніндукованого кальцієвого транзєнта (рис.4). Якщо така аплїкація відбувалася на третій секунді фази спаду, то амплїтуда додаткового

підвищення $[Ca^{2+}]_i$ становила $223 \text{ нмоль/л} \pm 42 \text{ нмоль/л}$ ($n=14$), а якщо на 5–6-й секунді, тоді – $416 \text{ нмоль/л} \pm 35 \text{ нмоль/л}$ ($n=8$). При кофеїніндукованому кальцієвому сигналі захоплення Ca^{2+} мітохондрїями починалося на 3–6-й секунді від початку аплїкації кофеїну, максимально ефективним захоплення Ca^{2+} мітохондрїями було на 12–16-й секунді спаду транзєнта, процес виведення іонів починав переважати над процесом захоплення на 36–40-й

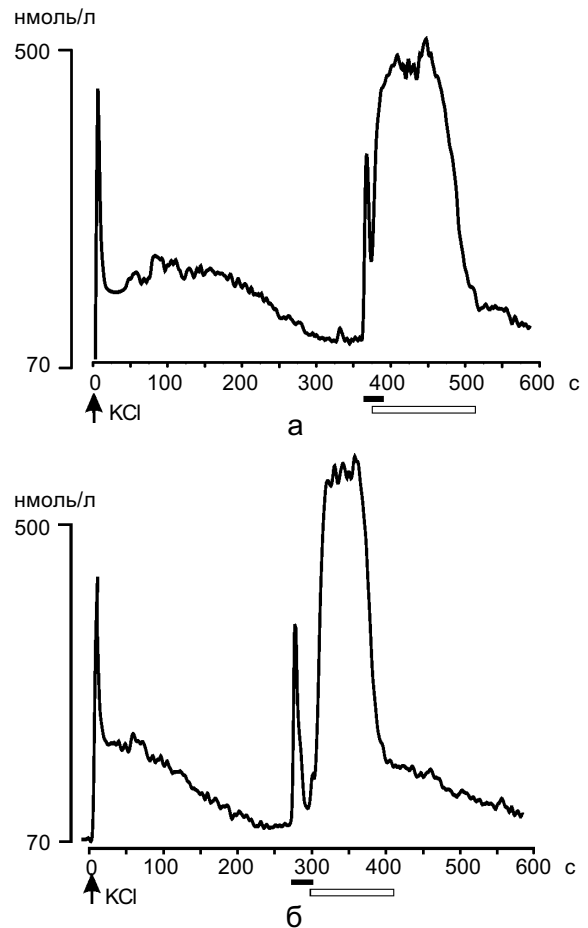


Рис. 4. Аплїкація СССР (⇐) на спаді кофеїніндукованого кальцієвого сигналу (—) на 3-й секунді спаду транзєнтного підвищення концентрації Ca^{2+} (а), на 6-й секунді спаду (б)

секунді спаду. На рис. 5 представлено кінетику роботи уніпортеру мітохондрій при різних джерелах надходження кальцію в цитозоль. Таким чином, мітохондрії включаються у захоплення Ca^{2+} незалежно від того, є джерелом іонів кальцію позаклітинне середовище чи внутрішньоклітинні кальцієві депо.

ОБГОВОРЕННЯ

Отримані результати свідчать про активну участь мітохондрій і ендоплазматичного ретикулума у формуванні кальцієвих сигналів, а також про тісний взаємозв'язок цих органел у процесі фізіологічної активності. У нейронах спинномозкових гангліїв активним кальцієвим депо є не тільки мітохондрії, а й ендоплазматичний ретикулум; таким чином, формування кальцієвих транзентів, викликаних активацією потенціалкерованих каналів плазматичної мембрани, зумовлено складним впливом кальцієвих каналів плазмолемі, мітохондрій і ендоплазматичного ретикулума. Тісна взаємодія мітохондрій і ендоплазматичного ретикулума спостерігалася на клітинах мозкової речовини надниркових залоз [9], культурі клітин HeLa [4], лінії RBL-2H3

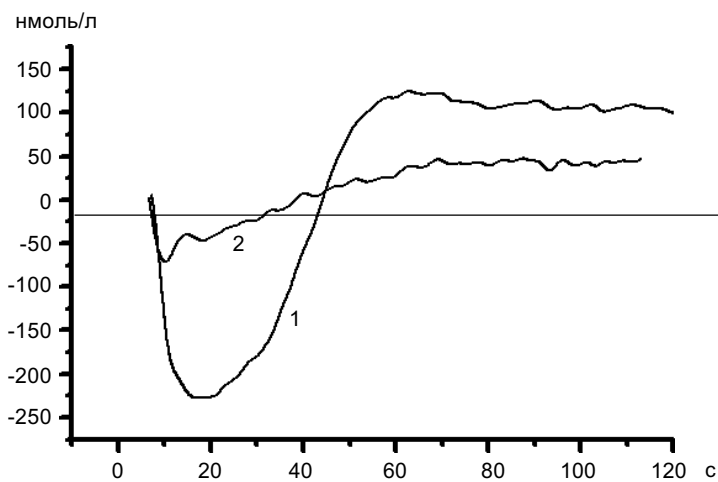


Рис. 5. Кінетика обміну Ca^{2+} мітохондріями при надходженні іонів з позаклітинного середовища (1) та з депо ендоплазматичного ретикулума (2)

тучних клітин [7]. Отримані результати дозволяють судити про істотні відмінності у взаємодії внутрішньоклітинних органел залежно від типу клітин. Основним фактором, що визначає характер взаємного функціонування внутрішньоклітинних органел, є просторове розташування мітохондрій у цитоплазмі клітини. На культурі нейронів гіпокампа за допомогою агента, що дестабілізує мікротрубочки цитоскелета – вінбластину, було показано зміни у кальцієвій сигналізації залежно від просторового розподілу мітохондрій у цитозолі [6]. У нашій лабораторії раніше було доведено, що у нейронах спинномозкових гангліїв, на відміну від нейронів дорсального рогу спинного мозку, основна маса мітохондрій розташована у досить тонкому примембранному шарі. Це зумовлює активну участь уніпортеру мітохондрій у захопленні Ca^{2+} , що надходить усередину клітини через кальцієві канали плазмолемі [12]. Результати наших експериментів підтверджують це положення. Мітохондрії активно включаються у захоплення Ca^{2+} , що проникає через плазматичну мембрану, водночас активно впливають на функціонування ендоплазматичного ретикулума. Причому на відміну від нейронів дорсальних гангліїв мишей [13], мітохондрії беруть участь у захопленні Ca^{2+} , що вивільняється з ендоплазматичного ретикулума. Цікавим є і факт можливої зворотної взаємодії – вивільнення Ca^{2+} з депо ендоплазматичного ретикулума у відповідь на їх виведення з мітохондрій [16]. Важливим і цікавим об'єктом майбутніх досліджень може бути цитозольна і мітохондріальна буферна ємність клітин і її вплив на взаємодію мітохондрій і ендоплазматичного ретикулума.

I.V. Stepanova, P.G. Kostyuk, E.P. Kostyuk**DYNAMIC INTERACTION BETWEEN PLASMA MEMBRANE STRUCTURES AND INTRACELLULAR CALCIUM STORES IN DRG NEURONS**

We studied the dynamic contribution of endoplasmic reticulum and mitochondria to depolarization-induced Ca^{2+} transients in small (18–24 μm) DRG neurons of rats. We have used the application of 10 μM of mitochondrial protonophore CCCP for switching off the calcium uptake by mitochondrial uniporter. For depletion of the store of endoplasmic reticulum we applied 1 μM of thapsigargin. Depolarization-induced transients in control conditions and in conditions when one of the mechanisms (mitochondria or endoplasmic reticulum) does not participate in the forming of the shape of Ca^{2+} transient have been studied. This allowed us to clarify the kinetics of mitochondrial and endoplasmic reticulum uptake and release of calcium in the process of the neuronal activity. We have determined the main characteristics of functioning of above-named calcium stores in the process of cell excitation, such as time of the beginning of uptake, time and duration of maximum activity etc. We concluded, that mitochondria and endoplasmic reticulum are acting in opposite directions at least in the phase of the beginning of the transient. Mitochondria are limiting the amplitude of the transient during depolarization, at the same time the endoplasmic reticulum is increasing the amplitude of the transient by CICR (calcium-induced calcium release) mechanism. Mitochondria store calcium released from endoplasmic reticulum by application of 30 mM caffeine. Inhibition of the mitochondrial uniporter results in reduction of amplitude of repetitive caffeine application compared with control conditions. We have compared the kinetics of mitochondrial participation in the formation of calcium signal when the initial sources of calcium ions were different. Our results allow us to suggest a close functional dynamic interactions between mitochondria and endoplasmic reticulum during calcium signaling in sensory neurons.

O.O. Bogomolets Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

International Centre for Molecular Physiology, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Berridge M.J. Neuronal calcium signaling // *Neuron*. – 1998. – №21. – P. 13–26.
2. Berridge M.J. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle // *Cell Calcium*. – 2002. – №5–6. – P. 235–249.
3. Carafoli E. Calcium signaling: a tale for all seasons // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2002. – №99. – P. 1115–1122.
4. Filippin L., Paulo J. Magalhaes L. et al. Stable interaction between mitochondria and endoplasmic reticulum allow rapid accumulation of calcium in a subpopulation of mitochondria // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **278**, №40. – P. 39224–39234.
5. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties // *J. Biol. Chem.* – 1985. – №6. – P. 3440–3450.
6. Guang J. W., Joshua G., Jackson et al. Altered distribution of mitochondria impairs calcium homeostasis in rat hippocampal neurons in culture // *J. Neurochem.* – 2003. – №87. – P. 85–94.
7. Hajnoczky G. Luminal communication between intracellular calcium stores modulated by GTP and cytoskeleton // *J. Biol. Chem.* – 1994. – №269. – P. 10280–10287.
8. Hajnoczky G., Robb-Gaspers L.D., Seitz M.B. et al. Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria // *Cell*. – 1995. – №82. – P. 415–424.
9. Montero M., Alonso M.T., Carnicero E. et al. Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca^{2+} transients that modulate secretion // *Nat. Cell. Biol.* – 2000. – №2. – P. 57–61.
10. Rizutto R., Bastianutto C., Brini M. et al. Mitochondrial Ca^{2+} homeostasis in intact cells // *Cell Biology*. – 1994. – №126. – P. 1183–1194.
11. Rizutto R., Brini M., Murgia M. et al. Microdomains with high Ca^{2+} concentration that are sensed by neighboring mitochondria // *Science*. – 1993. – №262. – P. 744–747.
12. Shishkin V., Potapenko E., Kostyuk E. et al. Role of mitochondria in intracellular calcium signaling in primary and secondary sensory neurons of rats // *Cell Calcium*. – 2002. – №32. – P. 121–130.
13. Svichar N., Kostyuk P., Verkhatsky A. Mitochondria buffer Ca^{2+} entry but not intracellular Ca^{2+} release in mouse DRG neurons // *NeuroReport*. – 1997. – №8. – P. 3929–3932.
14. Svichar N., Shishkin V., Kostyuk P. Mitochondrial participation in the modulation of calcium transients in DRG neurons // *Ibid.* – 1999. – №10. – P. 1257–1261.
15. Usachev Y., Shmigol A., Pronchuk P. et al. Caffeine-induced calcium release from internal stores in cultured rat sensory neurons // *Neuroscience*. – 1993. – №3. – P. 845–859.
16. Verkhatsky A. The endoplasmic reticulum and neuronal calcium signaling // *Cell Calcium*. – 2002. – №32. – P. 393–404.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;
Міжнар. центр молек. фізіології НАН України, Київ*

*Матеріал надійшов до
редакції 08.11.2004*