



УДК 577.15.024

О ЛОКАЛИЗАЦИИ КАЛЬМОДУЛИНА В
ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКЕ

ФУРАЕВ В. В., СУВОРОВ С. А.

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова
АН СССР, Ленинград

Молекулярные механизмы восприятия сигналов, переработки и передачи полученной информации в настоящее время представляют большой интерес для нейрохимии. В этом плане хеморецепторные клетки обонятельного эпителия представляют собой уникальный объект, поскольку являются первичными нейронами, то есть нейронами, воспринимающими сигнал непосредственно из окружающей среды. В этом отношении мембрана обонятельной клетки в известной мере подобна постсинаптической мембране, воспринимающей медиатор из части своего «окружения» — синаптической щели.

В синаптической передаче сейчас уделяют большое внимание роли кальмодулина (КМ) [1, 2]. Ранее нами было показано наличие в обонятельной выстилке (ОВ) большого количества КМ, сравнимого с его содержанием в ткани мозга [3, 4]. Однако вопрос о распределении КМ в обонятельном эпителии между обонятельными волосками, непосредственно воспринимающими химические стимулы, и остальной тканью и соотношении между водорастворимой и мембраносвязанной формами КМ оставался не изучен. Его выяснение являлось задачей настоящей работы.

Исследование было проведено на ОВ быка, которую отмывали в растворе Рингера, замораживали и гомогенизировали в жидком азоте. Для получения препарата КМ ткань экстрагировали 5-кратным объемом буфера (10 мМ трис-НСl, рН 7,5, 2 мМ ЭГТА, 1 мМ $MgSO_4$), центрифугировали при 12000g 40 мин. Осадок ресуспендировали в буфере 10 мМ трис-НСl, рН 7,5, 150 мМ КСl, 1 мМ $MgSO_4$ (буфер А) и снова центрифугировали при 12000g 40 мин. Надосадочные жидкости объединяли и использовали как препарат растворимой фракции КМ. Осадок, содержащий мембраны, обрабатывали буфером А с 1%-ным раствором тритона X-100 для экстракции мембраносвязанного КМ [5]. Полученные препараты перед определением содержания КМ подвергали кипячению на водяной бане при 98° 4 мин и центрифугировали затем при 12000g 40 мин. Препараты фракций, содержащих обонятельные волоски получали из свежей и отмытой выстилки обработкой буфером А с 0,1%-ным тритоном X-100 в течение 3 мин. Как показано в работе Брон-

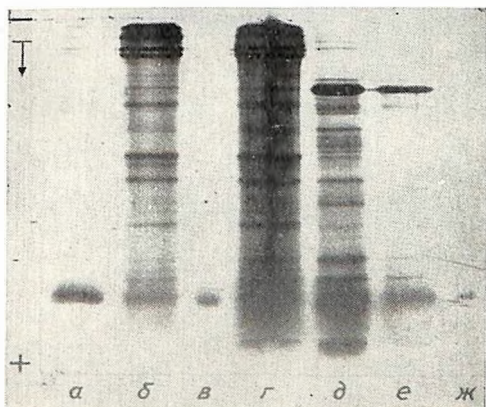


Рис. Электрофореграмма белков в ПААГ. Стандартный препарат каль-
модулина мозга (КМ): а—7,5 мкг, в, ж—1,5 мкг; мембранная фракция
ОВ: б—40 мкг белка+1,5 мкг КМ, в—67,7 мкг белка; растворимая
фракция ОВ: д—15 мкг белка; фракция, содержащая волоски: е—10 мкг
белка

штейн [6], при такой обработке волоски полностью растворялись за несколько десятков секунд. Далее взвесь, содержащую пелоски, подвергали такой же обработке, как и другие образцы тканей. Содержание КМ определяли по его способности активировать КМ-зависимую фосфодиэстеразу (ФДЭ) циклических нуклеотидов [5]. ФДЭ и очищенный препарат КМ получали из мозга быка, как описано в работе Суворова, Эттингоф [3]. Активность ФДЭ определяли по Cheng [7]. Для подавления действия протеаз при определении активности ФДЭ в пробы добавляли бычий сывороточный альбумин в концентрации 0,01%. Для подтверждения наличия КМ в исследуемых препаратах, их подвергали электрофорезу в 0,1%-ном ДДС-Na в 15%-ном ПЛАГ [8]. В качестве стандарта использовали очищенный препарат КМ мозга [3]. Белок определяли по Lowry и соавт. [9].

Из полученных результатов, представленных на рисунке, следует, что во всех препаратах проявлялась белковая полоса, соответствующая по подвижности чистому КМ. Обращает на себя внимание относительно большое количество КМ в волосках. Полоса, соответствующая КМ, была в этом препарате одной из наиболее выраженных (рис., е). Из средних данных, суммированных в таблице, очевидно, что доля мембраносвязанного КМ (37 мкг/г) составляет 25% от общего содержания КМ (растворимая и мембранная фракция). Эти ре-

Таблица

Содержание кальмодулина (КМ) во фракциях ткани обонятельной выстилки

Фракции	Вес взятой ткани вы- стилки, г	Количество экстракта, мл	Общее содержание КМ, мкг	Содержание КМ в мкг/г ткани выстилки
Фракция, содер- жащая волоски	1,1	4,0	3,7±0,2	3,4±0,2
Растворимая фракция	3,7	31,0	409±34	111±9
Мембранная фракция	2,7	5,8	100±7	37±3

зультаты согласуются с имеющимися данными о мембраносвязанном и цитозольном распределении КМ в ткани мозга [5]. В волосках содержится 3,4 мкг КМ/г ткани, что составляет 2,3% от его общего содержания в ОВ. Следует, однако, отметить, что доля волосков в выстилке по массе составляет примерно 0,2%. Эту цифру легко можно получить, основываясь на данных Менсо и соавт. [10] о диаметре, длине и количестве волосков в ОВ быка. Соответственно, содержание КМ в волосках по отношению к его содержанию в основной массе ОВ оказывается существенно выше. Для сравнения следует отметить, что содержание КМ в другой рецепторной структуре наружных сегментах палочек сетчатки весьма невелико [11]. Выяснение конкретной роли КМ в обонятельных волосках является задачей дальнейших исследований.

Таким образом, в ОВ присутствует белок с типичными для КМ свойствами и значительная его часть локализована в мембранной фракции и волосках, что дает основание для предположения о существенном значении КМ в процессе первичного восприятия химических сигналов.

CALMODULIN LOCALIZATION IN THE OLFACTORY EPITHELIUM

FURAEV V. V., SUVOROV S. A.

I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,
USSR Academy of Sciences, Leningrad

The distribution of calmodulin in different fractions of olfactory tissue was determined. Its amount in soluble fraction is 111 μg , in membranes—37 μg , and in olfactory cilia—3,4 μg per g of tissue. Taking into account that olfactory cilia compose no more than 0,2% of all olfactory epithelium we conclude that the content of calmodulin in cilia is the highest.

ЛИТЕРАТУРА

1. Grab D. V., Carlin R., Siekevits P. J. Cell. Biol., v. 86, p. 433—440, 1981.
2. Rephali A., Persons S. M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 79, p. 5783—5787, 1982.
3. Суворов С. А., Этингер Р. Н. Докл. АН СССР, т. 27, № 4, с. 1009—1012, 1983.
4. Острецова И. Б., Суворов С. А., Левко А. В., Этингер Р. Н. Биохимия, т. 49, № 5, с. 777—780, 1984.
5. Kakiuchi S., Yasuda S., Yamazaki R., Teshima Y., Kanda K., Kakiuchi P., Sobue K. J. Biochem., v. 92, № 1041—1048, 1982.
6. Бронштейн А. А. Обонятельные рецепторы позвоночных (под ред. Я. А. Винникова), Л., Наука, с. 116—124, 1977.
7. Cheung W. Y. Biochim. et biophys. acta, v. 191, № 303—315, 1969.
8. Laemmli U. K. Nature, v. 227, p. 680—684, 1970.
9. Lowry O. H., Rosenbrough N. I., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
10. Menco B. P. M., Leunissen J. L. M., Bannister L. H., Dodd G. H. Cell. Tiss. Res., v. 193, p. 503—524, 1978.
11. Kohnken R. E., Chanfoulus Y. G., Eidle D. M., Means A. R., McConnell D. G. J. Biol. Chem., v. 256, p. 12517—12520, 1981.

Поступила 20. VIII 1984