



УДК 577.352.4:6:2.829

АКТИВАЦИЯ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ СИНАПТОСОМ
НЕКОТОРЫМИ ФОСФОПЕПТИДАМИ НЕРВНОЙ ТКАНИ

МИКЕЛАДЗЕ Д. Г., КАЧАРАВА Д. Г., ГВАЛИЯ Н. В.

Институт физиологии им. И. С. Бериташвили АН ГССР, Тбилиси

Показано, что выделенные из гомогената ткани мозга подкисленными липорастворителями фосфопептиды увеличивают вход радиоактивного кальция в синаптосомы гораздо больше, чем это наблюдалось при деполяризации синаптосом вератрином и KCl, а также при инкубации синаптосом с ионофором А-23187. Действие фосфопептидов зависит от их концентрации и времени преинкубации с синаптосомами. Поглощение радиоактивного кальция, индуцируемое этими соединениями, ингибируется специфическим блокатором Ca^{2+} -каналов верапамилом. Эффекты фосфопептидов и деполяризующих агентов суммируются. Предполагается, что эти пептиды действуют на кальциевые каналы синаптосом.

Известно, что в регуляции многих нейрональных процессов ионам кальция принадлежит ведущая роль. Они осуществляют контроль над реакциями, связанными с синтезом и высвобождением нейромедиаторов [1], аксоплазматическим транспортом веществ [2], окислительным фосфорилированием и другими процессами [3].

Плазматическая мембрана клетки поддерживает градиент между внутриклеточной — микромолярной и внеклеточной — миллимолярной концентрациями кальция. Хотя в регуляции и обеспечении внутриклеточного пула кальция принимают участие такие структуры, как митохондрии, эндоплазматический ретикулум, кальцийсвязывающие белки (кальмодулин и другие), основная роль в этом процессе принадлежит плазматической мембране и локализованной в ней системе каналов кальция.

Из внеклеточного пространства вход кальция в клетку происходит по селективным кальциевым каналам, воротные механизмы которых могут сопрягаться либо с рецепторными белками нейромедиаторов, либо с потенциалчувствительными структурами мембран [4]. О структуре и механизме регуляции Ca^{2+} -каналов в настоящее время известно очень мало. Предполагается, что в активации этих каналов существенная роль принадлежит протеникиназным реакциям, которые регулируются системой циклических нуклеотидов [5].

Ранее нами из гомогената ткани мозга были выделены и идентифицированы фосфорилирующиеся *in vivo* пептиды, условно названные нами А, В, С [6], имеющие величину M_r в пределах 1 кД, обладающие низкой изоэлектрической точкой, содержащие кислые аминокислоты, глутамат и аспартат, а также серин. Они интенсивно фосфорилируются *in vivo*, и уровень их фосфорилирования зависит от функционального состояния ЦНС [7]. Учитывая, что фосфопептиды ткани мозга в наибольшем количестве представлены в миелине и плазматических мембранах, а также принимая во внимание их относительную гидрофобность [8], можно предположить, что они играют существенную роль в основных мембранных процессах клетки. С этой целью изучали действие этих пептидов на поглощение ^{45}Ca синапсосомами. Полученные данные свидетельствуют о том, что фосфопептиды могут регулировать активность Ca^{2+} -каналов синапсосом.

Материалы и методы

В опытах использовали взрослых крыс-самцов массой 200—250 г. Фосфопептиды А, В и С выделяли по ранее описанной методике [6]. Синапсосомы получали по Whittaker [9]. Очищенные синапсосомы, выделенные в градиенте сахарозы, осаждали центрифугированием и далее ресуспендировали в трис-Кребс-Рингер растворе (ТКР) из расчета 10 мг белка/1 мл раствора. Раствор ТКР содержал в мМ NaCl —145, KCl —5, CaCl_2 —1,2, MgCl_2 —1,3, $\text{N}_2\text{H}_4\text{O}_4$ —2,0, глюкозу—10,0, трис— HCl буфер, pH 7,4—10 (натриевый ТКР) [10].

Деполаризацию мембран вызывали изотоническим раствором ТКР, в котором концентрация NaCl была понижена до 95 мМ, а концентрация KCl повышена до 50 мМ (высококальневый ТКР). Оба раствора ТКР перед употреблением подвергали дегазации. Пренкубацию синапсосом в течение 20 мин при 30°C в присутствии и в отсутствие фосфопептидов проводили в натриевом ТКР, затем из синапсосомной суспензии отбирали пробы по 50 мкл, к одной добавляли 450 мкл высококальневого ТКР, а к другой—в таком же количестве натриевый ТКР. Оба раствора содержали 1,2 мМ ^{45}Ca (250 000 dpm). Поглощение ^{45}Ca останавливали после 10 с, добавляя к реакционной смеси 0,5 мл свободного от кальция натриевого ТКР, который дополнительно содержал 2 мМ ЭГТА. В дальнейшем суспензию фильтровали через 0,65 мкм фильтры марки «Millipore», которые трижды промывали охлажденным натриевым ТКР, высушивали и обрабатывали 1%-ным триптоном X-100 в 0,5 М HCl , радиоактивность измеряли в сцинтилляционной жидкости толуол-тригон (2:1) на счетчике SL-400 «Intertechnique» (Франция).

В пробы вносили вератрин в концентрации 75 мкМ в натриевом растворе ТКР. Концентрация инофора А-23187 в опытах составляла 100 нМ. Для блокирования Ca^{2+} -каналов синапсосом использовали верапамил в концентрации 25 мкМ в натриевом растворе ТКР.

Количество фосфопептидов определяли спектрофотометрически в проточной кювете спектрофотометра «Gilson» (Франция) при длине волны $\lambda = 220$ нм.

В работе использовали ЭГТА («Fluka», Швейцария), вератрин («Sigma», США), верапамил («Orion», Финляндия), инофор А-23187 («Sigma», США). Остальные реактивы отечественного производства квалификации ос. ч и х. ч.

Результаты и обсуждение

Как видно из таблицы, при действии деполаризующих агентов (K^+ и вератрина) на синапсосомные мембраны наблюдалось интен-

сивное поглощение ^{45}Ca синапсосомами, которое в течение 10 с составляло 3,84 и 3,36 нмоль $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /мг белка соответственно. В присутствии ионофора А-23187 количество поглощенного кальция в том же интервале времени равнялось 2,9 нмоль/мг белка. В отсутствие деполяризующих агентов и ионофора А-23187 (нормальный ТКР) синапсосомы поглощали кальций лишь в следовых количествах. Выделенные нами ранее фосфопептиды А и С инициировали накопление ^{45}Ca синапсосомами. Фосфопептид В эффекта не оказывал. Препикубация синапсосом с фосфопептидами А и С в концентрации 20 мкМ вызывала увеличение поглощения радиоактивного кальция в несколько раз по сравнению с контрольными препаратами, содержащими нормальный натриевый раствор ТКР. Индуцируемое пептидами поглощение кальция ингибировалось специфическим блокатором Ca^{2+} -каналов—верапамилом.

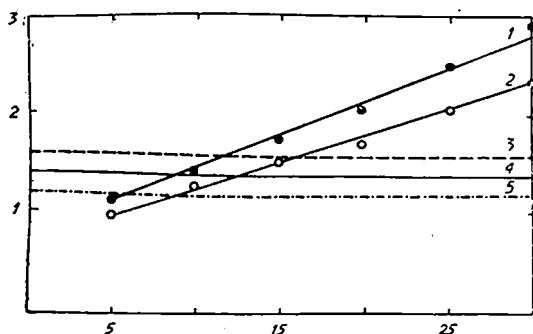


Рис. 1. Действие различных концентраций фосфопептидов А и С на поглощение ^{45}Ca синапсосомами. 1—фосфопептид А; 2—фосфопептид С; 3—KCl; 4—вератрин; 5—ионофор А-23187. По оси абсцисс—концентрация фосфопептидов в мкМ. По оси ординат— ^{45}Ca . 10dpm/мг белка/10 с

В другой серии опытов изучали влияние разных концентраций фосфопептидов А и С на поглощение ^{45}Ca . Как видно из рис. 1, при наличии в инкубационной среде 5 мкМ фосфопептида А и 10 мкМ фосфопептида С синапсосомы поглощали ^{45}Ca в таком же количестве, как и при действии 100 нМ ионофора А-23187. При увеличении концентрации фосфопептидов А и С соответственно до 10 и 15 мкМ синапсосомы поглощали столько же ^{45}Ca , сколько при вератриновой деполяризации, а увеличение концентрации фосфопептидов до 15 и 20 мкМ соответственно вызывало такое же поглощение ^{45}Ca , как при деполяризации синапсосомных мембран ионами калия. Дальнейшее увеличение концентрации фосфопептидов приводило к повышению входа ^{45}Ca в синапсосомы. Насыщение активации наблюдалось при увеличении концентрации фосфопептидов А и С в инкубационной среде до 30 мкМ.

Была также обнаружена зависимость активации Ca^{2+} -каналов от времени препикубации синапсосом с фосфопептидами А и С. На

рис. 2 показана зависимость поглощения ^{45}Ca синапсосомами от времени преникубации с фосфопептидом А. Увеличение времени преникубации синапсосом с пептидом от 5 до 20 мин вызывает повышение поглощения ^{45}Ca . Однако после 30 мин преникубации происходило уменьшение включения. Можно предположить, что увеличение времени преникубации синапсосом с фосфопептидом А до 30 мин вызывает в них определенные структурные изменения, вследствие чего понижается способность фосфопептида к активации кальциевых каналов.

Таблица
Поглощение ^{45}Ca синапсосомами при действии
деполяризирующих агентов, ионофора Ca^{2+} -ка-
налов и фосфопептидов.

Условия опыта (n=4)	Поглощение $^{45}\text{Ca}^{2+}$ - нмоль/мг белка/10 с
K^{+}	$3,84 \pm 0,04$
вератрин	$3,36 \pm 0,07$
ионофор А-23187	$2,88 \pm 0,04$
фосфопептид А	$4,80 \pm 0,05$
фосфопептид С	$4,08 \pm 0,06$
фосфопептид А + верапамил	$0,24 \pm 0,05$

Примечание. n-количество опытов.

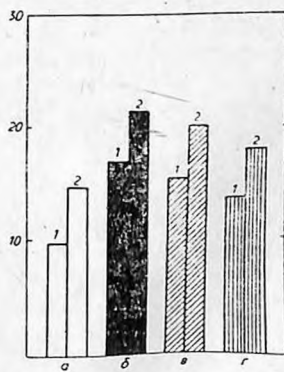
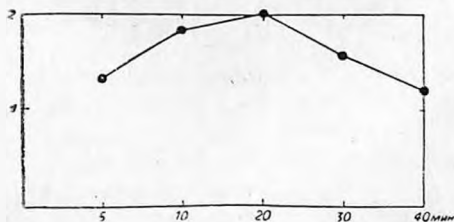


Рис. 2. Зависимость активации Ca^{2+} -каналов от времени преникубации синапсосом с фосфопептидом А. По оси ординат— ^{45}Ca . $10^3\text{dpm}/\text{мг}$ белка/10 с

Рис. 3. Действие фосфопептида А на поглощение ^{45}Ca синапсосомами в присутствии натриевого ТКР, деполяризирующих агентов и ионофора А-23187. а—натриевый ТКР; б—высококальциевый ТКР; в—вератрин; г—ионофор А-23187; 1—контроль; 2—в присутствии 20 мкМ фосфопептида А. По оси ординат— ^{45}Ca . $10^2\text{dpm}/\text{мг}$ белка

Интересным является также тот факт, что при действии фосфопептидов на поглощение ^{45}Ca в присутствии деполяризирующих агентов наблюдается синергизм (рис. 3). В присутствии фосфопептида А и

K^+ синаптосомы накапливали ^{45}Ca в количестве 5,2 нмоль/мг белка, что значительно выше количества поглощения кальция, индуцируемого этими агентами в отдельности (3,4 и 3,8 нмоль/мг белка соответственно). То же самое наблюдается в присутствии вератрина и фосфопептида А, а также ионофора кальциевых каналов—А-23187 и фосфопептида А. Интересен и тот факт, что эффект применения 20 мкМ фосфопептида А совместно с деполяризующими агентами и ионофором А-23187 выражается везде одинаково, то есть, если исключить эффекты KCl , вератрина и ионофора А-23187, эффект самого фосфопептида А во всех случаях равен 1,2 нмоль Ca^{2+} /мг белка.

Таким образом, вышеприведенные данные свидетельствуют о том, что выделенные ранее фосфопептиды [6] проявляют активность в отношении Ca^{2+} -каналов. Действие фосфопептидов зависит от их концентрации и времени инкубации с синаптосомами. Поглощение ^{45}Ca , индуцируемое этими соединениями, ингибируется специфическим блокатором кальциевых каналов—верапамилом, а их эффект является аддитивным по отношению к действию деполяризующих агентов.

В настоящее время предполагается, что белки Ca^{2+} -каналов могут быть сопряжены либо с рецепторами нейротрансмиттеров, либо с канальными белками потенциалчувствительных структур [4, 11]. Последние обуславливают K^+ -зависимую Ca^{2+} проводимость мембран и являются ответственными за быстрый, инактивирующийся в процессе деполяризации кальциевый ток [10]. Полученные в последнее время оригинальные данные Костюка и соавт. [5] свидетельствуют о том, что в структурных переходах потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов важную роль играют протеникиназные реакции, регулируемые циклическими нуклеотидами. Фосфорилирование канальных белков модулирует Ca^{2+} -канал и переводит его из пассивного состояния в активное [4].

Выделенные нами пептиды являются фосфорилированными по сериновым остаткам. Они хорошо растворимы как в водных, так и в органических растворителях [12] и содержатся в большом количестве в плазматических мембранах нервной клетки. Не исключено, что они, подобно некоторым синтетическим пептидам, проявляющим Ca^{2+} -ионофорные свойства [13], могут свободно транслоцироваться в мембранах и участвовать в структурной организации и модификации белковых ионных каналов.

ACTIVATION OF CALCIUM CHANNELS OF SYNAPTOSOMES BY SOME NERVE TISSUE PHOSPHOPEPTIDES

MIKELADZE D. G., KACHARAVA D. G., GVALIA N. B.

I. S. Beritashvili Institute of Physiology, Georgian SSR Academy
of Sciences, Tbilisi

The influence of some nerve tissue phosphopeptides on the calcium ion uptake by rat brain synaptosomes has been studied. The phosphopeptides extracted by acidic liposolvents from rat brain tissue homo-

genate lead to a considerably higher rate of radioactive calcium incorporation into synaptosomes than veratrine and A-23187 ionophore. The effect of phosphopeptides depends upon their concentration and preincubation time. The uptake of radioactive calcium induced by these compounds is inhibited by specific calcium channel antagonist—verapamil. The effect of phosphopeptides is summated with the action of depolarizing agents. These peptides are supposed to act on calcium channel of synaptosomes.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Kelly R. B., Deutsch J. W., Carlson S. S., Wagner J. A. *Ann. Rev. Neurosci.* v. 2, p. 399—466, 1979.
2. Solfer D. J. *Neurochem.*, v. 24, p. 21—33, 1975.
3. Magilen G., Gordon A., Au A., Diamond I. J. *Neurochem.*, v. 36, p. 1861—1864, 1981.
4. Glossmann H., Ferry D. R., Lubbecke F., Mewes R., Hofmann F. *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 3, p. 431—437, 1982.
5. Костюк П. Г., Дорощенко П. А., Мартынюк А. Е., Курский М. Д., Воробец З. Д. Докл. АН СССР, т. 271, с. 756—758, 1983.
6. Микеладзе Д. Г., Качаравა Д. Г. *Биохимия*, т. 47, с. 1125—1130, 1982.
7. Качаравა Д. Г., Микеладзе Д. Г., Чичуа А. И. *Сообщ. АН ГССР*, т. 103, с. 453—456, 1981.
8. Ledig M., Mandel P. *Biochimie*, v. 60, p. 25—24, 1978.
9. Whittaker V. P. *Handbook of Neurochem.* (ed. Lajtha A.), v. 2, p. 327—364. Plenum Press, N. Y.—L., 1969.
10. O'Leary M. E., Suszkiw J. B. J. *Neurochem.*, v. 4, p. 1192—1195, 1983.
11. Kostyuk P. G. *Biochim. et biophys. acta*, v. 650, p. 128—150, 1981.
12. Ledig M., Mandel P. *Biochimie*, v. 57, p. 1377—1384, 1975.
13. Spach G., Trudelle Y., Heltz F. *Biopolymers*, v. 22, p. 403—407, 1983.

Поступила 7. I 1985