

УДК 612.816

СаМКII участвует в вызванном холином торможении секреции ацетилхолина в моторных синапсах мышцы

А. Е. Гайдуков*, О. П. Балезина

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

*E-mail: gaydukov@gmail.com

Поступило в редакцию 07.07.2016

Принято к печати 03.10.2017

РЕФЕРАТ Исследовали участие кальций-зависимых ферментов – протеинкиназы С (РКС) и кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы типа II (СаМКII) – в каскаде реакций, запускаемых воздействием на пресинаптические никотиновые холинорецепторы альфа7-типа экзогенного холина, вызывающего подавление вызванного выброса ацетилхолина (АХ) в моторных синапсах мышцы. В присутствии блокатора РКС хелеритрина вызванная секреция АХ не изменялась, и сохранялась способность холина тормозить вызванный выброс АХ. Блокатор СаМКII KN-62 не влиял на активность синапсов, но полностью предотвращал торможение секреции АХ, вызванное холином.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА кальций/кальмодулин-зависимая протеинкиназа типа II, нервно-мышечный синапс, никотиновые холинорецепторы альфа7-типа, холин.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АХ – ацетилхолин; альфа7-нХР – никотиновые холинорецепторы альфа7-типа; МПКП – миниатюрные потенциалы концевой пластинки; ПКП – потенциалы концевой пластинки; РКС – протеинкиназа С; СаМКII – кальций/кальмодулин-зависимая протеинкиназа типа II.

ВВЕДЕНИЕ

Холин образуется в холинергических синапсах в результате гидролиза медиатора ацетилхолина (АХ) с помощью фермента ацетилхолинэстеразы. Наряду с обратным захватом в нервную терминаль для восполнения там синтеза АХ, холин играет важную роль в ауторегуляции секреции АХ по механизму обратной связи. Этот механизм реализуется благодаря способности холина избирательно активировать пресинаптические никотиновые холинорецепторы альфа7-типа (альфа7-нХР) [1]. Эти рецепторы широко представлены в центральных и периферических синапсах и известны не только своей способностью пропускать внутрь ионы натрия и кальция при активации холином и другими агонистами, деполяризуя мембрану, но и запускать разнообразные внутриклеточные каскады с участием ферментов и каналов [2]. Кроме того, недавно в молекуле альфа7-нХР нашли аминокислотный кластер, обеспечивающий их функциональное взаимодействие с G-белками. Это расширяет возможность работы альфа7-нХР не только как быстро десенситизируемых ионотропных рецепторов, но и как особых метаболитных рецепторов, осуществляющих длительную сигнализацию, приводящую к долговременным эффектам [3]. Таким образом, неоднозначность последствий активации пре-

синаптических альфа7-нХР в разных типах синапсов представляет малоизученную и актуальную проблему. Недавно мы установили, что в нервно-мышечных синапсах мышцы холин (0.1 мМ) подавляет вызванный выброс АХ, и этот тормозной эффект сопровождается Ca^{2+} -зависимым выбросом депонированного Ca^{2+} через риаодиновые рецепторы и далее – активацией Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов SK-типа терминалей, что и приводит к торможению секреции АХ [4]. При этом оставалось не ясным, может ли в данном каскаде участвовать активность Ca^{2+} -зависимых ферментов, таких, как протеинкиназа С (РКС) и/или кальций/кальмодулин-зависимая протеинкиназа типа II (СаМКII). В связи с этим целью данной работы было тестирование изменений секреции АХ в моторных синапсах мышцы, вызываемых холином в сочетании с действием блокаторов кальмодулина и Ca^{2+} -зависимых ферментов – СаМКII и РКС.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Эксперименты проводили на изолированных нервно-мышечных препаратах диафрагмальной мышцы (*m. diaphragma – n. phrenicus*) взрослых (P30) самцов мышей 129/Sv, полученных из Института нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАН,

Москва, Россия. Всего было использовано 16 животных. Мышей умерщвляли посредством быстрого обезглавливания. Животных содержали в соответствии с Директивой 86/609/ЕЕС по обращению человека с лабораторными животными, протокол был одобрен комиссией по биоэтике биологического факультета МГУ. Все эксперименты проводили при комнатной температуре 20–22°C. Использовали стандартный, ранее описанный нами протокол приготовления рассеченного нервно-мышечного препарата левой полудиафрагмы с диафрагмальным нервом [4]. Миниатюрные потенциалы концевой пластинки (МПКП) и вызванные раздражением диафрагмального нерва многоквантовые потенциалы концевой пластинки (ПКП) регистрировали с помощью внутриклеточных стеклянных микроэлектродов, заполненных 2.5 М КСl (сопротивление кончика микроэлектрода 15–20 МОм). Регистрации ПКП в каждом синапсе предшествовала регистрация МПКП в течение 100 с, затем стимулировали диафрагмальный нерв в режиме короткого ритмического залпа (50 стимулов длительностью 0.1 мс с частотой 50 Гц). Сигналы регистрировали с использованием усилителя Neuroprobe Amplifier Model 1600 (A-M Systems), сигналы на жесткий диск компьютера записывали с помощью аналого-цифрового преобразователя E-154 с интерфейсом PowerGraph (L-Card). Данные затем обрабатывали в программе MiniAnalysis (Synaptosoft). В контроле регистрировали МПКП и ПКП от пяти и более разных синапсов, после чего в перфузионный раствор в определенном порядке добавляли исследуемые вещества, далее регистрировали активность разных синапсов на протяжении 1–1.5 ч. В каждой серии экспериментов использовали не менее трех нервно-мышечных препаратов. В работе использовали холин, хелеритрин (Sigma, США), W-7, KN-62 (Enzo Life Sciences, США). Оценивали амплитуду, временной ход МПКП и ПКП, частоту МПКП и квантовый состав ПКП (его рассчитывали как отношение средней скорректированной на нелинейную сумму амплитуды ПКП [5] к средней амплитуде МПКП). Статистическую значимость различий между выборками оценивали по *t*-критерию Стьюдента и критерию Манна–Уитни. Уровень значимости отличий между двумя выборками составлял 0.05 (*n* – количество исследованных синапсов).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пресинаптическое действие холина, как и в предыдущей нашей работе [4], изучали при его концентрации 100 мкМ, близкой к имеющейся в синаптической щели при расщеплении АХ и незначительно превышающей EC_{50} для активации альфа7-нХР [6].

Холин не вызывал значимых изменений мембранного потенциала мышечных волокон, а также частоты генерации спонтанных МПКП. Средняя амплитуда МПКП на фоне действия холина (1.08 ± 0.09 мВ ($n = 17$)) также не изменялась значимо по сравнению с контролем (1.05 ± 0.08 мВ ($n = 15$), $p > 0.05$). При запуске коротких ритмических залпов (50 Гц, 1 с) наблюдали характерные изменения амплитуды и квантового состава ПКП по ходу залпа. Вслед за кратковременным облегчением передачи развивалась депрессия в виде снижения амплитуды ПКП по сравнению с первым в залпе, после чего амплитуда ПКП (и квантовый состав) устанавливается на постоянном сниженном уровне по сравнению с первым ПКП (рис. 1). При перерыве между залпами порядка 2 мин и более картина повторных залпов в отдельном синапсе или других тестируемых синапсах устойчиво воспроизводилась. Аппликация холина приводила к снижению амплитуды ПКП в залпе за счет снижения их квантового состава. Значения квантового состава ПКП под действием холина статистически значимо снижались по всему ходу залпа по сравнению с контролем до 64–71% ($p < 0.05$). При этом рисунок залпа в целом остался неизменным (рис. 1). Уменьшение амплитуды и квантового состава ПКП наблюдалось, начиная с 15–20 мин от начала воздействия холина, и сохранялось на сниженном уровне на протяжении всего времени аппликации холина (в течение 45–60 мин).

Эффекты блокатора РКС хелеритрина

Аппликация на мышцу блокатора РКС хелеритрина (4 мкМ) в течение 30–40 мин не вызывала значимых изменений характера залповой синаптической активности – ни квантовый состав ПКП по ходу залпа, ни сам рисунок залпа (начальное облегчение, последующая депрессия, фаза «плато») достоверно не изменялись под действием хелеритрина ($p > 0.05$). Более того, хелеритрин никак не повлиял и на тормозные эффекты холина в отношении квантового состава ПКП при залповой активности синапсов (рис. 2А). Отсюда следует, что и Ca^{2+} -сигналы, поступающие в терминаль при активации холином альфа7-нХР с последующим выбросом депонированного кальция, и возможная метаботропная сигнализация альфа7-нХР с участием G_q -белка, как показано на других объектах [3], не способны активировать РКС и вовлечь ее в торможение секреции АХ в моторных синапсах. Это согласуется с нашими и опубликованными данными, где показано, что в моторных терминалях активация РКС может запускаться входом кальция в терминаль через другие Ca^{2+} -входы, в частности, при работе Ca^{2+} -каналов L-типа, и соучаствовать в облегчении секреции АХ [7].

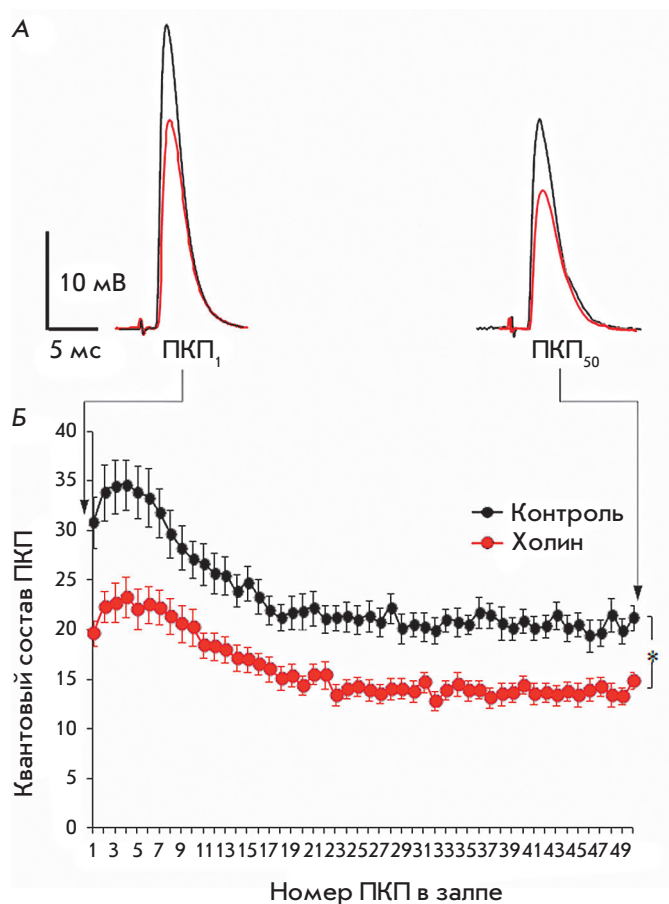


Рис. 1. Тормозное влияние экзогенного холина (100 мкМ) на вызванную секрецию АХ при ритмической активности синапсов с частотой 50 Гц (1 с). А – усредненные записи первых ПКП (ПКП₁) и последних ПКП (ПКП₅₀) в залпах – в контроле (черный) и в присутствии холина (красный). Б – изменение квантового состава ПКП по ходу короткого ритмического залпа ПКП в контроле и в присутствии холина. По оси ординат – квантовый состав ПКП, по оси абсцисс – порядковый номер ПКП в коротком залпе. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем

Эффекты блокатора кальмодулина W-7

Следующим шагом работы было исследование эффектов холина на фоне предварительного выключения регуляторной активности кальмодулина с помощью его ингибитора W-7 (10 мкМ). Блокатор кальмодулина не оказывал собственного действия на передачу и не влиял значительно на тормозной эффект холина в отношении вызванной секреции АХ, хотя тормозное действие холина в условиях ингибирования кальмодулина было менее выражено, чем при действии только холина (рис. 2Б).

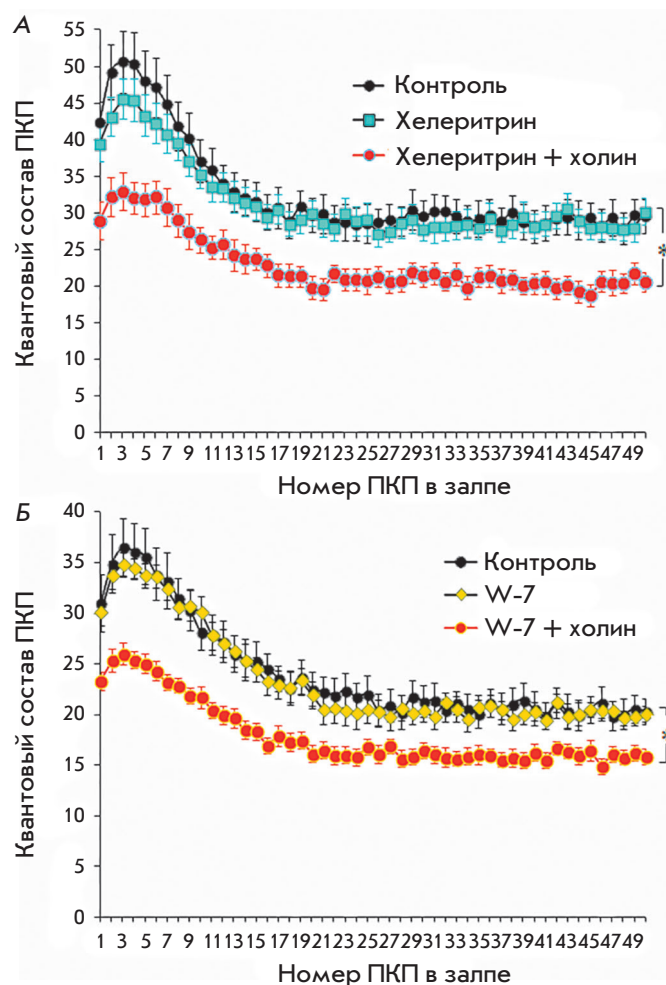


Рис. 2. Изменение квантового состава ПКП по ходу короткого ритмического залпа ПКП при ритмической активности синапсов с частотой 50 Гц. А – в контроле, в присутствии 4 мкМ хелеритрина и при действии 100 мкМ холина на фоне хелеритрина. Б – в контроле ($n = 17$), при действии 10 мкМ W-7 ($n = 15$) и под действием холина (100 мкМ) на фоне W-7 ($n = 18$). По осям ординат – квантовый состав ПКП, по осям абсцисс – порядковый номер ПКП в коротком залпе. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем

Эффекты блокатора СаМКП KN-62

В последней серии изучали возможную активацию и участие собственно СаМКП в тормозных эффектах холина. Для этого использовали избирательный блокатор СаМКП – KN-62 (3 мкМ). При перфузии нервно-мышечного препарата раствором, содержащим KN-62, в течение 30–40 мин мы не обнаружили значимых сдвигов ни амплитуды МПКП, ни изменений квантового состава ПКП по ходу коротких залпов. Так, амплитуда МПКП в контроле составляет 0.91 ± 0.05 мВ ($n = 20$), при действии KN-62

0.85 ± 0.04 мВ ($n = 23$, $p > 0.05$), а на фоне холина в присутствии KN-62 – 0.83 ± 0.06 мВ ($n = 25$). Однако на фоне действия KN-62 на моторные синапсы аппликация холина не вызвала достоверного снижения амплитуды и квантового состава ПКП в залпе по сравнению с контролем (рис. 3).

Это показывает, что обнаруженное нами ранее подавление выброса АХ при действии холина на пресинаптические альфа7-нХР предполагает, наряду с другими процессами [4], активацию СаМКII и ее участие в торможении секреции медиатора.

В настоящее время в терминалях центральных и периферических синапсов выявлена активация пресинаптической СаМКII как за счет входов наружного [8], так и выброса внутриклеточного кальция [9], и возможность ее разнонаправленного влияния на секрецию медиаторов и комедиаторов [9, 10]. При активации альфа7-нХР эндогенным либо экзогенным холином в синапсах ЦНС наблюдается модуляция вызванного выброса медиатора. Недавно в синапсах гиппокампа описана генерация кальциевого сигнала при воздействии холина на пресинаптические альфа7-нХР, приводящая к возрастанию амплитуды возбуждающих постсинаптических потенциалов, однако эти эффекты не сопровождалась активацией СаМКII и сохранялись в присутствии блокатора KN-62 [11]. Ранее нами впервые было показано, что в периферических синапсах мышцы активация альфа7-нХР холином приводит к торможению вызванной секреции медиатора АХ, и это торможение можно полностью предотвратить блокированием риаодиновых рецепторов или SK-каналов [4]. Настоящая работа существенно дополняет эти представления. Оказалось, что в механизмах ауторегуляции секреции АХ с участием холина и альфа7-нХР участвует также и СаМКII. Выявленная нами вовлеченность СаМКII в ауторегуляцию секреции АХ позволяет добавить эту киназу к уже описанной совокупности ферментов, способных по-разному участвовать в передаче сигнала при активации альфа7-нХР в разных типах клеток [3, 11]. Таким образом, при исследовании роли альфа7-нХР в регуляции клеточных процессов необходимо учитывать возможность активации СаМКII.

До сих пор единственным примером участия СаМКII в работе нервно-мышечных синапсов грызунов была обнаруженная нами недавно активация

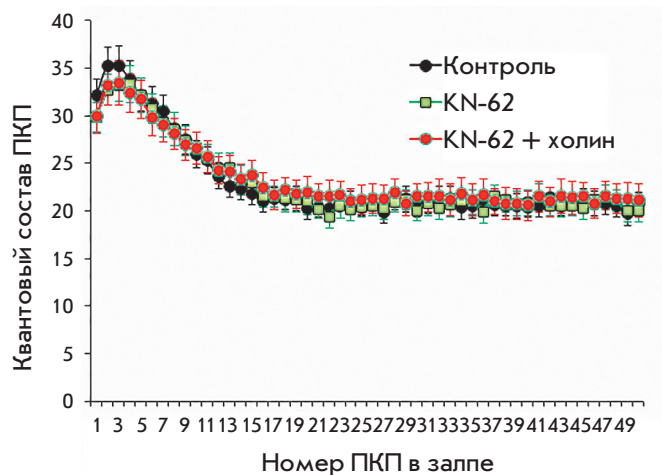


Рис. 3. Изменение квантового состава по ходу короткого ритмического залпа ПКП с частотой 50 Гц в контроле, при действии 3 мкМ KN-62 и под действием холина (100 мкМ) на фоне KN-62. По оси ординат – квантовый состав ПКП, по оси абсцисс – порядковый номер ПКП в коротком залпе

и вклад фермента в усиление секреции АХ при входе кальция по L-типу кальциевых каналов [12]. В данной работе впервые описан качественно отличный способ активации и участия СаМКII в работе терминалей, когда активация альфа7-нХР сопровождается вовлечением СаМКII в торможение секреции АХ. Роль популяции СаМКII, расположенной в непосредственной близости от альфа7-нХР и внутри-терминальных кальциевых депо, может заключаться в усилении и продлении обеспечиваемого работой риаодиновых рецепторов кальциевого сигнала, необходимого для активации калиевых каналов SK-типа.

Таким образом, в моторных нервных терминалях мышцы впервые выявлен каскад реакций, запускаемый действием холина на пресинаптические альфа7-нХР, приводящий к подавлению секреции АХ. Показано, что в этом каскаде задействованы не только выброс депонированного кальция и кальций-активируемые K^+ -каналы SK-типа, но и активность Ca^{2+} -зависимого фермента СаМКII. ●

Работа поддержана РФФИ
(грант № 13-04-00413а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Albuquerque E.X., Pereira E.F., Alkondon M., Rogers S.W. // *Physiol. Rev.* 2009. V. 89. № 1. P. 73–120.
2. Cheng Q., Yakel J.L. // *Biochem. Pharmacol.* 2015. V. 97. № 4. P. 439–444.

3. King J.R., Nordman J.C., Bridges S.P., Lin M.K., Kabbani N. // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. № 33. P. 20060–20070.
4. Гайдуков А.Е., Богачева П.О., Тарасова Е.О., Балезина О.П. // *Acta Naturae.* 2014. Т. 6. № 4. С. 117–122.
5. McLachlan E.M., Martin A.R. // *J. Physiol.* 1981. V. 311. P. 307–324.

6. Papke R.L., Porter Papke J.K. // Br. J. Pharmacol. 2002. V. 137. № 1. P. 49–61.
7. Гайдуков А.Е., Марченкова А.А., Балезина О.П. // Бюл. эксп. биол. мед. 2012. Т. 153. № 4. С. 400–405.
8. Zhong C., Talmage D.A., Role L.W. // PLoS One. 2013. V. 8. № 12. e82719.
9. de Jong A.P., Verhage M. // Curr. Opin. Neurobiol. 2009 V. 19. № 3. P. 245–253.
10. Shakiryanova D., Klose M.K., Zhou Y., Gu T., Deitcher D.L., Atwood H.L., Hewes R.S., Levitan E.S. // J. Neurosci. 2007. V. 27. № 29. P. 7799–7806.
11. Cheng Q., Yakel J.L. // J. Neurosci. 2014. V. 34. № 1. P. 123–144.
12. Тарасова Е.О., Гайдуков А.Е., Балезина О.П. // Нейрохимия. 2015. Т. 32. № 2. С. 123–130.