

БИОХИМИЯ, БИОФИЗИКА,
МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 576.32/.36

ТРИФЛУОПЕРАЗИН ПОДАВЛЯЕТ
В МАКРОФАГАХ ДЕПОЗАВИСИМЫЙ ВХОД Ca^{2+}

© 2018 г. З. И. Крутецкая*, Л. С. Миленина, А. А. Наумова, С. Н. Бутов,
В. Г. Антонов, академик РАН А. Д. Ноздрачев

Поступило 16.10.2017 г.

При использовании флуоресцентного Ca^{2+} -зонда Fura-2AM впервые показано, что преинкубация макрофагов с ингибитором кальсеквестрина – нейрореплетиком трифлуоперазином – приводит к значительному подавлению депозависимого входа Ca^{2+} , индуцируемого ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином или циклопязониковой кислотой в перитонеальных макрофагах крыс. Полученные результаты свидетельствуют о возможном участии кальсеквестрина в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} в макрофаги.

DOI: 10.7868/S0869565218060191

Универсальным механизмом регулируемого входа Ca^{2+} в клетки эукариот является депозависимый или “ёмкостный” вход Ca^{2+} [1, 2]. В соответствии с моделью “ёмкостного” входа Ca^{2+} этот процесс регулируется степенью заполнения депо Ca^{2+} таким образом, что опустошение депо активирует вход Ca^{2+} [1, 2].

Функциональной единицей депозависимого входа Ca^{2+} является мультимолекулярный белковый комплекс SOCIC (store-operated calcium influx complex), компоненты которого обладают высокой мобильностью и взаимодействия между ними жёстко регулируются [2, 3]. Основными компонентами комплекса, необходимыми и достаточными для активации депозависимого входа Ca^{2+} , являются Ca^{2+} -каналы Orai1 в плазмалемме и Ca^{2+} -сенсор STIM1 в мембране Ca^{2+} -депо [2, 3]. При опустошении Ca^{2+} -депо STIM1 олигомеризуется, транслоцируется в участки эндоплазматического ретикулума, расположенные у плазмалеммы, и прямо взаимодействует с белками Orai1, вызывая депозависимый вход Ca^{2+} [2, 3].

Одним из основных буферов Ca^{2+} в полости сарко-эндоплазматического ретикулума является белок кальсеквестрин (CSQ). При низкой концентрации Ca^{2+} в депо CSQ присутствует в полости депо в виде мономера. При увеличении концентрации Ca^{2+} в депо CSQ претерпевает димеризацию и последующую полимеризацию [4]. Обнаружено, что кальсеквестрин 1 (CSQ1) экспрессируется не

только в скелетных мышцах, но и в невозбудимых клетках и играет важную роль в регуляции мобилизации Ca^{2+} из депо в тромбоцитах человека и крысы [5]. Кроме того, в последнее время показано, что мономерный CSQ1 участвует в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} в скелетных мышцах [6] и ряде невозбудимых клеток [5, 7].

В связи с этим целью настоящей работы явилось исследование возможной роли CSQ в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} , индуцируемого ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз – тапсигаргином (ТГ) и циклопязониковой кислотой (ЦПК) – в перитонеальных макрофагах крыс.

В опытах использовали ингибитор CSQ – нейрореплетик фенотиазинового ряда трифлуоперазин (трифтазин, ТФП), который связывается с CSQ, ингибирует его сборку и последующую агрегацию при повышении концентрации Ca^{2+} в полости депо, то есть приводит к увеличению доли мономерного CSQ [4, 8].

Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крыс популяции Wistar при комнатной температуре 20–22 °С через 1–2 сут после начала культивирования клеток. Подробно процедура культивирования макрофагов и описание автоматизированной установки для измерения внутриклеточной концентрации $[\text{Ca}^{2+}]_i$ на базе флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B (“Leica Microsystems”, Германия) изложены нами ранее [9]. Для измерения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ использовали флуоресцентный зонд Fura-2AM (“Sigma-Aldrich”, США). Возбуждение флуоресценции объекта производили при длинах волн

Санкт-Петербургский государственный университет
*E-mail: z.kruteckaya@spbu.ru

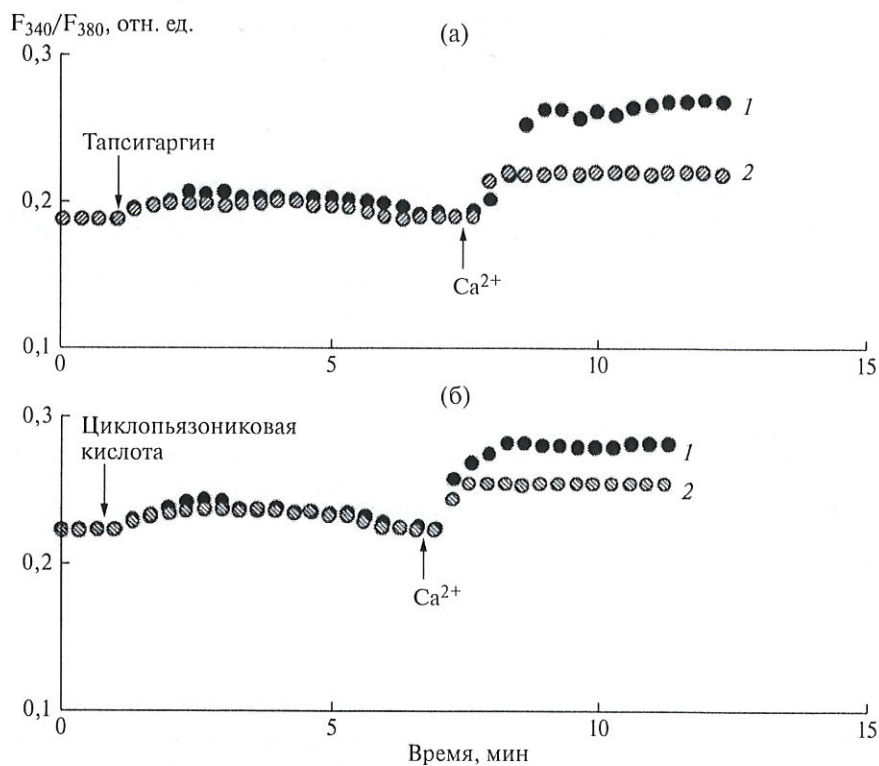


Рис. 1. Влияние трифлуоперазина на Ca^{2+} -ответы, вызываемые тапсигаргином (а) или циклопязониковой кислотой (б) в перитонеальных макрофагах крыс. По оси ординат – отношение интенсивностей флуоресценции Fura-2AM F_{340}/F_{380} при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм соответственно (относительные единицы, отн. ед.). По оси абсцисс – время. Фрагмент рисунка (а), кривая 1 – клетки стимулировали 0,5 мкМ тапсигаргина в номинально бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; кривая 2 – макрофаги предварительно инкубировали в течение 10 мин с 2 мкг/мл трифлуоперазина в бескальциевой среде, затем стимулировали 0,5 мкМ тапсигаргина, после чего вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} . Фрагмент (б), кривая 1 – макрофаги стимулировали 10 мкМ циклопязониковой кислоты в бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} индуцировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; кривая 2 – клетки преинкубировали в течение 10 мин с 2 мкг/мл трифлуоперазина в бескальциевой среде, затем стимулировали 10 мкМ циклопязониковой кислоты, после чего вход Ca^{2+} инициировали добавлением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} . Каждая регистрация получена для группы из 40–50 клеток и представляет собой типичный вариант из 7 независимых экспериментов.

340 и 380 нм, эмиссию регистрировали при длине волны 510 нм. Для избежания фотовыгорания измерения проводили через каждые 20 с, облучая объект в течение 2 с. Значения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ рассчитывали по уравнению Гринкевича [10]. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью критерия t Стьюдента. Достоверными считали различия при $p \leq 0,05$.

На рис. 1 приведены результаты типичных экспериментов. Данные представлены в виде графика изменения отношения интенсивностей флуоресценции Fura-2AM при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм (отношение F_{340}/F_{380}) во времени, отражающего динамику изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в клетках в зависимости от времени измерения [11].

В предварительных контрольных экспериментах мы обнаружили, что добавление 0,5 мкМ ТГ

к макрофагам, находящимся в бескальциевой среде, вызывает незначительное увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, отражающее мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо (рис. 1а, кривая 1). В среднем (по данным 7 экспериментов) увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время фазы мобилизации Ca^{2+} из депо составило 25 ± 9 нМ. При последующем введении в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} наблюдался депозависимый вход Ca^{2+} в цитозоль (рис. 1а, кривая 1). В среднем (по данным 7 экспериментов) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время входа Ca^{2+} увеличилась до 80 ± 20 нМ. Аналогичные результаты мы получили при использовании 10 мкМ ЦПК (рис. 1б, кривая 1). В среднем (по данным 7 экспериментов) увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время фазы мобилизации Ca^{2+} из депо, вызываемой ЦПК, составило 22 ± 8 нМ, а во время входа Ca^{2+} 52 ± 10 нМ (рис. 1б, кривая 1).

Мы впервые обнаружили, что преинкубация макрофагов с 2 мкг/мл ТФП в течение 10 мин до введения 0,5 мкМ ТГ практически не влияла на фазу мобилизации Ca^{2+} из депо, но значительно (по данным 7 экспериментов на $66,7 \pm 11,2\%$) подавляла последующий депозависимый вход Ca^{2+} в макрофаги (рис. 1а, кривая 2). Аналогичные результаты были получены в опытах с применением 10 мкМ ЦПК (рис. 1б, кривая 2). В среднем (по данным 7 экспериментов) подавление ТФП депозависимого входа Ca^{2+} , вызываемого ЦПК, составило $57,3 \pm 13,4\%$.

Таким образом, в настоящей работе мы впервые на перитонеальных макрофагах крысы показали, что ингибитор кальсеквестрина ТФП подавляет депозависимый вход Ca^{2+} , индуцируемый ТГ или ЦПК в макрофагах. Полученные данные согласуются с результатами исследований других авторов, которые обнаружили, что ТФП подавляет депозависимый вход Ca^{2+} , вызываемый АТФ в клетках промиелоцитарного лейкоза линии HL-60 [12, 13], и прямо блокирует потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы в гладкомышечных клетках крысы [14]. Кроме того, на клетках эмбриональной почки человека (линия НЕК-293) было ранее показано, что преинкубация клеток с ТФП приводит к существенному подавлению депозависимого входа Ca^{2+} , вызываемого ТГ [7]. Фаза мобилизации Ca^{2+} из депо при этом не изменяется. Авторы цитируемой работы предложили следующий механизм подавления депозависимого входа Ca^{2+} при действии ТФП. Обработка клеток ТФП приводит к увеличению доли мономерного CSQ1 в депо. Мономерный CSQ1 прямо взаимодействует со STIM1, препятствует взаимодействию STIM1 с Orai1 и активации депозависимого входа Ca^{2+} при воздействии ТГ [7, 15]. Аналогичный механизм регуляции кальсеквестрином депозависимого входа Ca^{2+} может иметь место и в перитонеальных макрофагах, что объясняет в наших экспериментах подавление трифлуоперазином Ca^{2+} -ответов, вызываемых ТГ или ЦПК.

Полученные нами данные о подавлении трифлуоперазином депозависимого входа Ca^{2+} сви-

детельствуют о возможном участии кальсеквестрина в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги крысы и позволяют рассматривать кальсеквестрин в качестве нового регуляторного компонента сигнального комплекса депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Putney J.W. // Cell Calcium. 1990. V. 11. P. 611–624.
2. Prakriya M., Lewis R.S. // Physiol. Rev. 2015. V. 95. P. 1383–1436.
3. Vaca L. // Cell Calcium. 2010. V. 47. P. 199–209.
4. He Z., Dunker A.K., Wesson C.R., et al. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 24635–24641.
5. Zhu Z., Zhou H., Yu X., et al. // J. Thromb. Haemost. 2012. V. 10. P. 116–124.
6. Shin D.W., Pan Z., Kim E.K., et al. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 3286–3292.
7. Wang L., Zhang L., Li S., et al. // Sci. Rept. 2015. V. 5. 11349. P. 1–12.
8. Charlier H.A., Olson R.D., Thornock C.M., et al. // Mol. Pharmacol. 2005. V. 67. P. 1505–1512.
9. Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Наумова А.А. и др. // Цитология. 2015. Т. 57. № 7. С. 518–525.
10. Grynkiwicz G., Poenie M., Tsien R.Y. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. P. 3440–3450.
11. Xie Q., Zhang Y., Zhai C., et al. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 16559–16566.
12. Harper J.L., Shin Y., Daly J.W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 14912–14917.
13. Harper J.L., Daly J.W. // Drug Dev. Res. 1999. V. 47. P. 107–117.
14. Nakazawa K., Higo K., Abe K., et al. // Brit. J. Pharmacol. 1993. V. 109. P. 137–141.
15. Zhang L., Wang L., Li S., et al. // Cell Physiol. Biochem. 2016. V. 38. P. 2183–2193.