

## ОЦЕНКА МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ПУЛА КАЛЬЦИЯ В СИНАПСОСОМАХ МОЗГА КРЫС С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДА Rhod-2 AM

© 2016 г. С.В. Гриневич, Т.В. Васим, С.В. Федорович

*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,  
220072, Минск, ул. Академическая, 27, Республика Беларусь*

*E-mail: fedorovich@ibp.org.by*

Поступила в редакцию 26.05.16 г.

Литературные данные о роли синаптических митохондрий в регуляции цитозольной концентрации кальция носят противоречивый характер. В работе изучено депонирование кальция митохондриями синапсом мозга крыс с помощью флуоресцентного зонда Rhod-2. Показано, что добавление 60 мМ KCl увеличивает флуоресценцию Rhod-2. Замена  $K^+$  на  $Na^+$  или удаление  $Ca^{2+}$  из инкубационной среды полностью ингибирует данный эффект. Протонный ионофор карбонилцианид-4-(трифторметокси)фенилгидразон и смесь митохондриальных токсинов ротенона и олигомицина снижают рост флуоресценции Rhod-2 в два раза. Ингибитор АТФазы эндоплазматического ретикулума тапсигаргин (1 мкМ), в отличие от ингибитора АТФазы синаптических везикул бафиломицина (500 нМ), также вызывает вход кальция в митохондрии. Добавление кальция к синапсосомам с сохраненным потенциалом плазматической мембраны увеличивает флуоресценцию Rhod-2, однако этот эффект нечувствителен к карбонилцианид-4-(трифторметокси)фенилгидразону. Показано, что митохондрии являются кальциевыми депо в синапсосомах только при высокой концентрации кальция в цитозоле.

*Ключевые слова: синапсосомы, Rhod-2, кальций, митохондрии, синапс, эндоплазматический ретикулум.*

Митохондрии не только являются биоэнергетическими станциями клетки, но и участвуют во внутриклеточной сигнализации [1–3]. Одной из важных сигнальных функций митохондрий является депонирование кальция [1,2,4].

Пресинаптические окончания нейронов содержат митохондрии, причем на них приходится около трети всего объема [5]. С помощью флуоресцентного зонда Rhod-2 показано, что митохондрии в синапсах чашечки Хелда способны депонировать кальций [6], далее этот вывод был подтвержден с нейронами гиппокампа и генетически кодируемым сенсором mito-GCaMP2 [7]. Транспорт кальция в митохондрии осуществляется унипортером [4,8]. Этот транспортер имеет низкую аффинность [1,3]. Кинетические свойства кальциевого унипортера позволяют предположить, что митохондрии будут выполнять функцию депо для кальция только при возбужденном состоянии клетки и, соответственно, при высоком содержании этого иона в цитозоле [1,3]. Экспериментальные результаты подтверждают эту точку зрения [6]. Также показано, что кальций в синаптических митохондриях не может инициировать освобождение нейромедиаторов, но регулирует эндоцитоз [7].

В то же время в экспериментах с использованием синапсом показано, что освобождение кальция из митохондрий с помощью  $Na^+/Ca^{2+}$ -обменника играет ключевую роль в индукции освобождения нейромедиаторов при калиевой деполяризации [9,10]. Это предполагает наличие кальция во внутрисинапсомальных митохондриях и его невысокую концентрацию в цитозоле. В то же время в указанных работах не измерялся уровень внутримитохондриального кальция. Как известно, для кальциевой сигнализации важны не только усредненные значения концентрации этого иона в цитозоле, но и так называемые микродомены, возникающие возле мест входа или освобождения  $Ca^{2+}$  из депо на достаточно короткий промежуток времени [4,11]. Синапсы чашечки Хелда представляют собой гигантские синапсы, что делает их удобными для изучения, но кальциевые микродомены в них могут существенно отличаться от микродоменов в пресинаптических окончаниях, имеющих размер около 600 нм [5,12]. В данном исследовании мы изучили депонирование кальция митохондриями в синапсосомах мозга крыс с помощью флуоресцентного зонда ксантилиум-9-[4-бис[2-[(ацетилокси)метокси]-2-оксиэтил]амино]-3-[2[2-бис[2-[(аце-

тил-окси)метокси]-2-оксиэтил]амино]фенокси]этоксифенил-3,6-бис(диметиламино)-бромид (Rhod-2 AM).

Rhod-2 – положительно заряженный флуоресцентный зонд. Он способен связываться с кальцием, но обладает более низкой аффинностью по сравнению с распространенными зондами Fura-2 и Fluo-3. При инкубации клеток с его ацетоксиметильным эфиром большая часть Rhod-2 оказывается в митохондриях и по изменениям его флуоресценции можно судить о накоплении кальция в митохондриях [13].

В качестве основного объекта мы использовали синапсомы, изолированные пресинаптические окончания нейронов. Они способны к экзоцитозу и освобождению нейромедиаторов в ответ на увеличение концентрации кальция в цитозоле, имеют внутрисинапсомальные митохондрии, способны поддерживать потенциал плазматической и митохондриальной мембраны [5,14–17].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы реактивы: 4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфоновая кислота (HEPES) (Merck, Германия); карбонилцианид-4-(трифторметокси)фенилгидразон (СССР) и ротенон (Calbiochem, США), тапсигаргин, бафиломицин, олигомицин, Rhod-2 AM, ЭГТА (все – производства Sigma, США). Остальные использованные реактивы имели квалификацию не ниже «ос.ч».

**Выделение синапсом.** Синапсомы изолировали из полушарий мозга крыс по методу Хайоша [18]. Полученный осадок суспендировали в среде А следующего ионного состава (в мМ): NaCl – 132, KCl – 5, MgCl<sub>2</sub> – 1,3, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,2, глюкоза – 10, HEPES – 10, pH 7,4. Перед экспериментом суспензию синапсом (10–20 мг/мл белка) преинкубировали 10 мин при 37°C, после чего помещали на лед и использовали в эксперименте в течение 3 ч.

**Определение содержания кальция во внутрисинапсомальных митохондриях.** Содержание кальция во внутрисинапсомальных митохондриях определяли с помощью флуоресцентного зонда Rhod-2 согласно работе [13].

Синапсомы дополнительно однократно отмывали. Суспензию синапсом инкубировали 30 мин при 37°C в присутствии 10 мкМ зонда. Экстраклеточный зонд удаляли трехкратным центрифугированием, осадок суспендировали в инкубационной среде А.

Для измерения митохондриального кальция 200 мкл предварительно загруженных зондом синапсом добавляли в кювету, содержащую

1,8 мл инкубационной среды А. Флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США) в термостатируемой кювете (37°C) при  $\lambda_{\text{возб}} = 550$  нм,  $\lambda_{\text{рег}} = 571$  нм, ширине щелей 5 нм и постоянном перемешивании. СССР, ротенон и олигомицин добавляли непосредственно в кювету.

Белок определяли с помощью метода Лоури [19] с использованием бычьего сывороточного альбумина как стандарта.

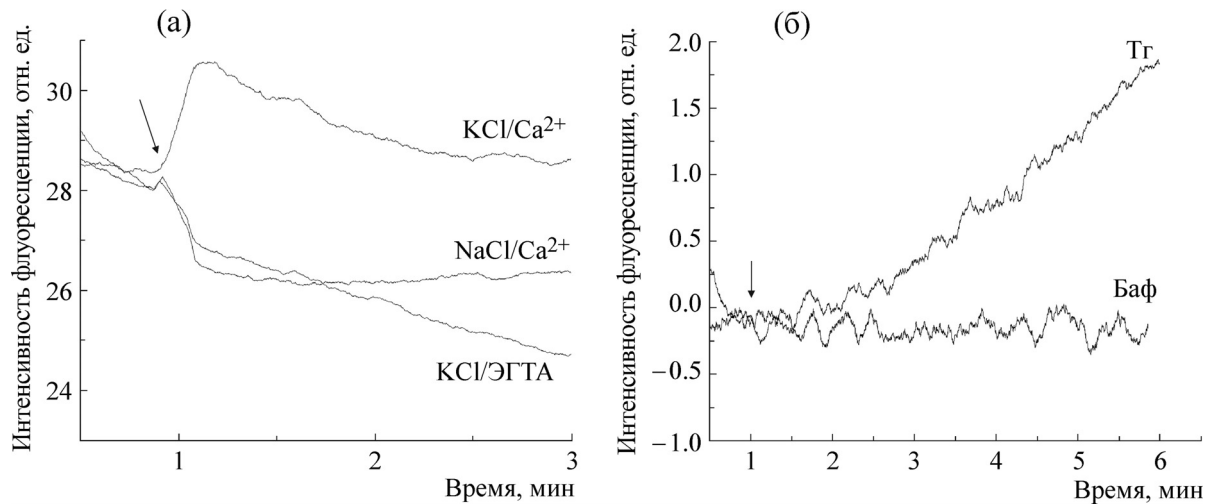
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе мы изучили влияния входа кальция в синапсомы через потенциал-чувствительные каналы. На рис. 1а показано, что калиевая деполяризация в присутствии кальция приводит к увеличению флуоресценции Rhod-2. Аналогичная добавка натрия или калиевая деполяризация в отсутствие кальция были неэффективными (рис. 1а).

Кроме кальция, поступающего из внешней среды, митохондрии могут захватывать кальций, освобождающийся из внутриклеточных депо [11]. Показано, что в синапсомах в качестве кальциевого депо может выступать эндоплазматический ретикулум [20], кроме того, в пресинаптических окончаниях нейронов в этой же роли, вероятно, могут выступать синаптические везикулы [21,22]. Мы изучили влияние тапсигаргина, ингибитора кальциевой АТФазы, которая локализована на мембране эндоплазматического ретикулума, и бафиломицина, ингибитора протонной АТФазы, которая локализована на мембранах синаптических везикул. На рис. 1б показано, что тапсигаргин, но не бафиломицин, вызывает увеличение флуоресценции Rhod-2. Используемой нами концентрации бафиломицина (500 нМ) было достаточно для полного ингибирования протонной АТФазы [17]. На рис. 2а видно, что увеличение флуоресценции было статистически достоверным, причем эффект тапсигаргина был сопоставим с эффектом калиевой деполяризации.

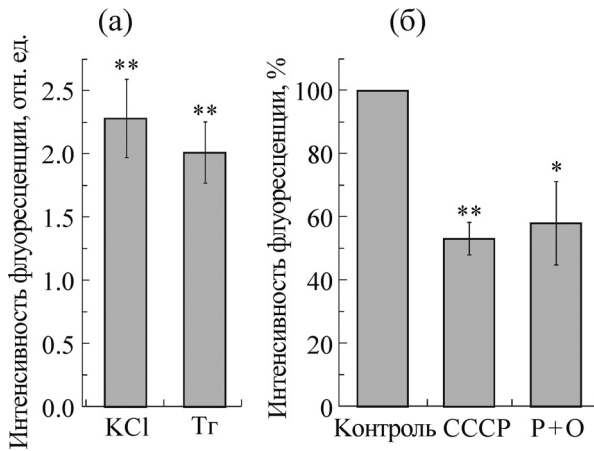
Далее мы изучили действие протонного ионофора СССР и смеси митохондриальных токсинов ротенона и олигомицина на увеличение флуоресценции зонда, индуцированное калиевой деполяризацией. Эти вещества снижают мембранный потенциал внутрисинапсомальных митондрией, фактически «выключая» их [16,23]. Из рис. 2б видно, что предобработка синапсом митохондриальными ядами частично блокирует эффект высокой концентрации калия. Таким образом, как минимум часть сигнала имеет митохондриальную природу.

На следующем этапе мы изучили эффект кальция, добавленного к синапсомам с со-



**Рис. 1.** Влияние калиевой деполаризации (а), тапсигаргина и бафиломицина (б) на флуоресценцию зонда Rhod-2 в синапсосомах. Стрелкой указан момент внесения добавок в кювету: KCl/Ca – было добавлено 60 мМ KCl, инкубационная среда содержала 2 мМ Ca<sup>2+</sup>; KCl/ЭГТА – было добавлено 60 мМ KCl, инкубационная среда без Ca<sup>2+</sup>, но с добавлением 10 мкМ ЭГТА; NaCl/Ca – было добавлено 60 мМ NaCl, инкубационная среда содержала 2 мМ Ca<sup>2+</sup>; Тг – было добавлено 1 мкМ тапсигаргина; Баф – было добавлено 500 нМ бафиломицина А1. Представленные кривые отражают результаты восьми независимых измерений.

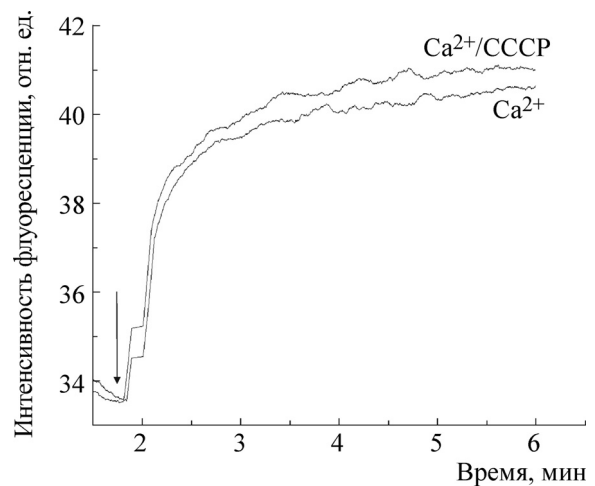
храненным потенциалом плазматической мембраны. В этом случае синапсосомы находились



**Рис. 2.** Влияние тапсигаргина (а) и митохондриальных токсинов (б) на увеличение флуоресценции Rhod-2 в синапсосомах, индуцированное калиевой деполаризацией: KCl – после добавки 60 мМ KCl за 5 мин; Тг – после добавки 1 мкМ тапсигаргина за 5 мин; К – контроль, после добавки 60 мМ KCl за 5 мин; CCCP – после добавки 60 мМ KCl за 4 мин, в инкубационную среду добавлено 10 мкМ CCCP; P + O – после добавки 60 мМ KCl за 4 мин, в инкубационную среду добавлено 10 мкМ ротенона и 5 мкг/мл олигомицина. За 100% взято увеличение флуоресценции после добавки 60 мМ KCl за 5 мин. \* $P \leq 0,05$  по отношению к контролю (ответ на KCl без митохондриальных токсинов); \*\* $P \leq 0,01$  по отношению к нулю (а) или к контролю (б). В качестве контроля на (б) взят ответ на KCl без митохондриальных токсинов. Представлены средние значения восьми экспериментов  $\pm Sx$ .

в стандартной инкубационной среде, содержащей 5 мМ K<sup>+</sup>. На рис. 3 видно, что в этом случае кальций вызвал увеличение флуоресценции зонда Rhod-2, однако оно не ингибировалось протонным ионофором CCCP. Можно предположить, что в этом случае сигнал связан с зондом в цитозоле или даже во внешней среде, но не во внутрисинапсосомальных митохондриях.

Таким образом, мы показали, что флуоресцентный зонд Rhod-2 AM можно использовать



**Рис. 3.** Влияние кальция на флуоресценцию Rhod-2 в поляризованных синапсосомах. Стрелкой указан момент внесения в кювету 2 мМ CaCl<sub>2</sub>. Ca/CCCP – в инкубационную среду дополнительно было добавлено 10 мкМ CCCP. Представленные кривые отражают результаты пяти независимых измерений.

для оценки митохондриального пула кальция в синапсосомах. В то же время следует отметить, что, вероятно, не весь зонд локализован в митохондриях и цитозольная форма может вносить свой вклад в увеличение флуоресценции (рис. 2б). Сходное распределение зонда было описано и другими авторами [24].

Мы показали, что митохондрии являются кальциевыми депо в синапсосомах при избыточном входе кальция из внешней среды через потенциал-чувствительные каналы или освобождении этого иона из эндоплазматического ретикулула (рис. 1, 2). Нам не удалось найти доказательств, что митохондрии могут быть депо для кальция при его освобождении из синаптических везикул или при нормальной концентрации этого иона в цитозоле (рис. 1б, 3).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. O. Kann and R. Kovacs, *Am. J. Physiol.* **292**, C641 (2007).
2. M. J. Mattson, M. Gleichman, and A. Cheng, *Neuron* **60**, 748 (2008).
3. H. Manji, T. Kato, N. A. Di Prospero, et al., *Nature Rev. Neurosci.* **13**, 293 (2012).
4. R. Rizzuto, D. De Stefani, A. Raffaello, et al., *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* **13**, 566 (2012).
5. B. G. Wilhelm, S. Mandad, S. Truckenbrodt, et al., *Science* **344**, 1023 (2014).
6. B. Billups, and I. D. Forsythe, *J. Neurosci.* **22**, 5840 (2002).
7. J. R. Marland, P. Hasel, K. Bonnycastle, et al., *J. Biol. Chem.* **291**, 2080 (2016).
8. K. J. Kamer and V. K. Mootha, *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* **16**, 545 (2015).
9. L. Raiteri, S. Stigliani, L. Zedda L. et al., *J. Neurochem.* **80**, 706 (2002).
10. L. Raiteri, S. Zapettini, M. Milanese, et al., *J. Neurochem.* **103**, 952 (2007).
11. R. Rizzuto and T. Pozzan, *Physiol. Rev.* **86**, 369 (2006).
12. L. Y. Wang and G. J. Augustine, *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 455 (2015).
13. G. A. Rutter, P. Burnett, R. Rizzuto, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5489 (1996).
14. T. V. Waseem, A. A. Rakovich, T. V. Lavrukevich, et al., *Neurochem. Int.* **46**, 235 (2005).
15. T. V. Waseem and S. V. Fedorovich, *Neurochem. Res.* **35**, 1188 (2010).
16. A. V. Alekseenko, V. V. Lemeshchenko, T. G. Pekun, et al., *Neurosci. Lett.*, **513**, 238 (2012).
17. S. V. Hrynevich, T. G. Pekun, T.V. Waseem et al., *Neurochem. Res.* **40**, 1188 (2015).
18. F. Hajos, *Brain Res.* **93**, 485 (1975).
19. O. Lowry, H. Rosenbrough, H. Farr, et al. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
20. H. Rasgado-Flores and M. P. Blaustein, *Am. J. Physiol.* **252**, C588 (1987).
21. N. R. Mahapatra, M. Mahata, P. P. Hazra et al., *J. Biol. Chem.* **279**, 51107 (2004).
22. J. Cordeiro, P. P. Goncalves and Y. Dunant, *J. Physiol.* **589**, 149 (2011).
23. Т. Г. Пекун, Т. В. Васим и С. В. Федорович, *Биофизика* **59** (1), 100 (2014).
24. E. J. Kaftan, T. Xu, R. F. Abercrombie, et al., *J. Biol. Chem.* **275**, 25465 (2000).

## Estimation of Mitochondrial Calcium Pool in Rat Brain Synaptosomes Using Fluorescent Dye Rhod-2 AM

S.V. Hrynevich, T.V. Waseem, and S.V. Fedorovich

*Institute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus,  
Akademicheskaya ul. 27, Minsk, 220072 Belarus*

Literature data on the role of synaptic mitochondria in regulation of cytosolic calcium level are contradictory. In present paper we investigate calcium storing by mitochondria in rat brain synaptosomes using fluorescent dye Rhod-2. Addition of 60 mM KCl increases Rhod-2 fluorescence. This effect is completely abolished by replacing K<sup>+</sup> with Na<sup>+</sup> or withdrawing Ca<sup>2+</sup> from incubation medium. A proton ionophore, carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone, and the mixture of rotenone/oligomycin mitochondrial toxins cause a two-fold decrease in Rhod-2 fluorescence. Thapsigargin, an inhibitor of endoplasmic reticulum ATPase (1 μM), but not bafilomycin, an inhibitor of ATPase in synaptic vesicles (500 nM) also leads to mitochondrial calcium influx. The addition of calcium to synaptosomes with saved plasma membrane potential increased the Rhod-2 fluorescence, however this effect was insensitive to carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone. We have shown that mitochondria can serve as a calcium store in synaptosomes only in case of high cytosolic concentration of calcium.

*Key words: synaptosomes, Rhod-2, calcium, mitochondria, synapse, endoplasmic reticulum*