

Н.Я. Бойко, В.В. Кучер, Н.Х. Погорела, І.С. Магура

Прояви пластичності потенціалкерованої калієвої провідності клітин РС-12 при змінах зовнішньоклітинної концентрації K^+

Сложные механизмы интегрирования сигналов в нейронах связаны с функционированием различных типов ионных каналов, особенно калиевых. Характерная для каждого типа нейронов комбинация калиевых каналов обеспечивает широкий спектр проявлений возбудимости и позволяет каждому нейрону отвечать специфическим образом на данный входящий сигнал в данное время. Свойства многих разновидностей калиевых каналов могут модулироваться путем действия вторичных посредников, активируемых нейромедиаторами, изменениями внеклеточной концентрации калия, а также других стимулов. Калиевые каналы представляют собой наиболее распространенные мишени для действия многих сигнальных систем.

ВСТУП

Інтегративна активність нейронів значною мірою пов'язана з механізмами їх електричної збудливості, що зумовлена різними типами потенціалкерованих натрієвих, калієвих, кальцієвих каналів [9]. Електрофізіологічні та молекулярно-біологічні дослідження останніх років виявили багато типів перелічених каналів [8]. Особливим різноманіттям і поліфункціональністю відрізняються калієві канали. Їх роль у різних проявах діяльності нейронів є предметом численних сучасних досліджень, оскільки різновидність електричних характеристик різних типів нейронів частково зумовлена вибірковою експресією в них комбінації калієвих каналів з різними властивостями [11]. Ці канали також беруть участь у регуляції мембранного потенціалу і, таким чином, модулюють електричну збудливість клітин та електрохімічну рушійну силу для різноманітних транспортних механізмів [2].

Розрізняють три основних підтипи калієвих каналів з принципово різними механіз-

мами регуляції: потенціалкеровані калієві канали, кальційзалежні калієві канали та різноманітні калієві канали вхідного випрямлення [4, 10]. Потенціалкеровані калієві канали безпосередньо беруть участь у формуванні змін мембранного потенціалу під час розвитку потенціалу дії в усіх збудливих клітинах. Від активності цих каналів залежить частота генерації потенціалів дії [1]. Вони відіграють певну роль у клітинних механізмах навчання і пам'яті [4]. Окрім потенціалкерованих калієвих каналів в цих процесах беруть участь кальцій- і АТФ-чутливі калієві канали, а також інші типи згаданих каналів, зокрема ті, що регулюються G-білками [6]. Регуляція калієвих каналів також здійснюється їх фосфорилуванням і нековалентними взаємодіями з іонами, нуклеотидами, киснем і такими зарядженими сполуками, як поліаміни. Експресія калієвих каналів у різних типах клітин динамічно регулюється [4]. Молекулярний аналіз подій, що відбуваються при різних неврологічних захворюваннях, зокрема хворобі Альцгеймера,

© Н.Я. Бойко, В.В. Кучер, Н.Х. Погорела, І.С. Магура

виявив певні зміни в регуляції і функції калієвих каналів нервових клітин [4].

З'ясування властивостей ворітних механізмів та ідентифікація структур, що зумовлюють їх функціонування та модуляцію, залишається головним питанням у вивченні іонних каналів. Особливої уваги заслуговує модуляція властивостей ворітних механізмів потенціалкерованих калієвих каналів проникаючими іонами [7]. Це стосується зокрема їх механізмів інактивації. Вони різноманітні і варіабельні. Найбільш вивченими і поширеними є механізми N- і C-типу інактивації. Окрім того, повільну інактивацію C-типу можна розділити на C- та P-типи.

N-тип інактивації пов'язаний з невеликою групою амінокислотних залишків у NH₂-кінцевій послідовності, яка перекриває внутрішньоклітинний вхід активованого калієвого каналу. Інактивація C-типу зумовлена відносно повільними конформаційними змінами зовнішнього входу в канал. Між N- і C- типами інактивації може існувати певний зв'язок [3].

Накопичення іонів калію у примембранному просторі виникає в природних умовах під час інтенсивної електричної активності і може впливати як на стан селективного фільтра калієвих каналів, збільшуючи ймовірність заселення каналу K⁺, так і на різні прояви інактивації.

Мета нашої роботи – вивчення характеру впливу K⁺ на механізми інактивації.

МЕТОДИКА

Для досліджень була використана лінія недиференційованих клітин феохромоцитоми щура PC-12. Клоновані клітини феохромоцитоми (PC-12) походять від хроматинних клітин мозкової частини надниркової залози та являють собою зручну модельну систему для вивчення регуляції нейрональної збудливості [5].

Клітини PC-12 вирощували в моношарі в пластикових флаконах Карреля (25 мл) і

пасивували кожні 3–4 доби у співвідношенні 1:3. Склад середовища культивування був наступним: 85% RPMI-1640 (рН 7,4), 10% термоінактивованої кінської сироватки і 5% ембріональної сироватки великої рогатої худоби (всі компоненти виробництва фірми “Sigma”, США). Культура перебувала в інкубаторі у зволоженому газовому середовищі (повітря збагачене 5% CO₂) при +37 °C. Для дослідів клітини в кінці лаг-періоду (приблизно 24 год) механічно видаляли з дна флакона, переносили в пластикові чашки Петрі і витримували близько 1 год для прикріплення клітин до дна чашки.

Для дослідження властивостей потенціалкерованих калієвих каналів клітин PC-12 застосовували метод фіксації напруги з відведенням від усїєї клітини (patch-clamp whole cell recording), що дозволяє реєструвати інтегральний калієвий струм через притаманну PC-12 сукупність потенціалкерованих калієвих каналів. Опір скляних мікропіпеток, заповнених зазначеним нижче розчином, перебував у межах 1–3 МОм.

Перед дослідом культуральне середовище замінювали на зовнішньоклітинний розчин наступного складу (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 5, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 2, глюкоза – 10, тріс-HCl – 10 (рН 7,4). Піпетки заповнювали розчином, що містив (ммоль/л): KCl – 135, NaCl – 5, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 2, EGTA – 5, тріс-HCl – 10 (рН 7,4). Підвищення зовнішньоклітинної концентрації K⁺ здійснювали за допомогою заміни у позаклітинному розчині NaCl на еквівалентну кількість KCl. Досліди проводили при +20°C.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

З метою вивчення впливу проникних іонів на механізми інактивації калієвих каналів здійснювали реєстрації інтегральних калієвих струмів при підвищених зовнішньоклітинних концентраціях іонів калію ([K⁺]_o). На рис. 1 наведено нормовані реєстрації інтегральних калієвих струмів при “прямо-

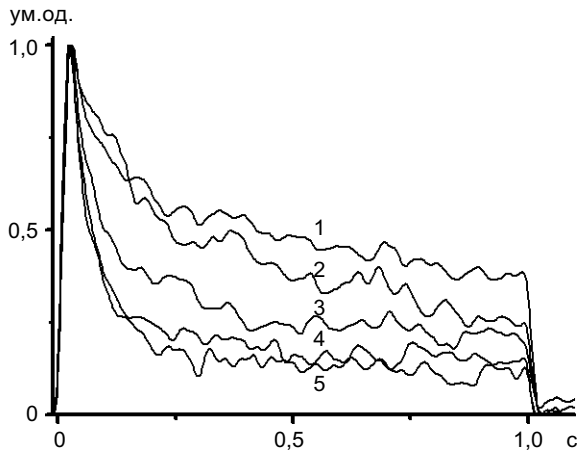


Рис. 1. Вплив зміни зовнішньоклітинної концентрації іонів калію на калієві іонні струми (1 – 5 ммоль/л (норма), 2 – 10, 3 – 20, 4 – 30, 5 – 40 ммоль/л). Інтегральні калієві струми, зареєстровані у відповідь на «прямокутні» зміщення мембранного потенціалу від -80 мВ (підтримуваний потенціал) до $+20$ мВ тривалістю кожного 1 с

кутних» зміщеннях мембранного потенціалу від -80 мВ (підтримуваний потенціал) до $+20$ мВ у нормі ($[K^+]_o$ становить 5 ммоль/л) та при підвищенні $[K^+]_o$ до 10, 20, 30 та 40 ммоль/л. У нормі спостерігали лише повільну інактивацію. Вона була досить виразною тільки при позитивних значеннях мембранного потенціалу. За умов підвищеної $[K^+]_o$ швидкість інактивації значно збільшилась і більш чітко виявлялася і при негативних значеннях мембранного потенціалу.

Зміна $[K^+]_o$ впливає не тільки на саму інактивацію, але і на швидкість виходу з неї. На рис. 2 наведено нормовані реєстрації інтегральних калієвих струмів при двоімпульсному зміщенні мембранного потенціалу від -80 мВ (підтримуваний потенціал) до $+20$ мВ при нормальній $[K^+]_o$, що становила 5 ммоль/л та при $[K^+]_o$, 20 ммоль/л. Перше зміщення мембранного потенціалу до $+20$ мВ протягом півсекунди стимулювало виникнення та розвиток інактивації. Друге – дозволяло виявити зміни калієвої провідності внаслідок процесів інактивації та виходу з інактивації, що могли спосте-

рігатися під час реполяризації протягом однієї секунди до рівня -80 мВ після першого зміщення мембранного потенціалу. Як видно з рис. 2, в нормі при реполяризації спостерігався подальший розвиток інактивації. Такий прояв процесу інактивації має назву кумулятивної інактивації і характерний для повільної інактивації P/C-типу, вихід з якої відбувається досить повільно. При підвищених $[K^+]_o$ реполяризація мембрани викликала часткове усунення інактивації. Ознак кумулятивної інактивації не спостерігали, що є результатом прискорення процесу виходу з інактивації.

Відомі два механізми впливу проникних іонів на процес повільної інактивації калієвих каналів. Найбільш вивченим є механізм „нога в дверях”, коли іон у селективному фільтрі перешкоджає розвитку повільної інактивації. Інший механізм, що спостерігався в наших дослідах майже невивчений.

Такі зміни властивостей механізмів інактивації можуть бути наслідком калій-залежного впливу на конформацію калієвих каналів. З метою виявлення конформацій-

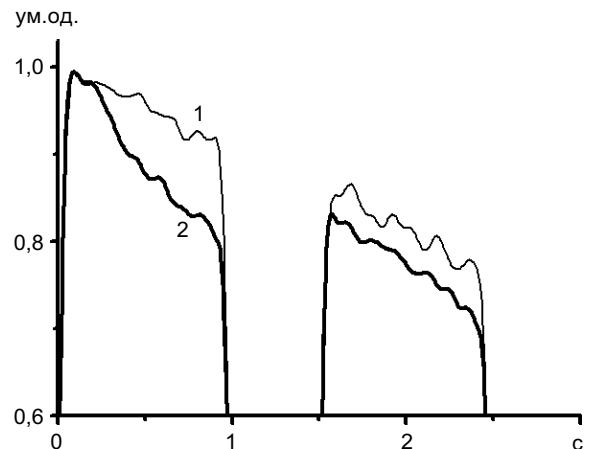


Рис. 2. Вплив зміни зовнішньоклітинної концентрації іонів калію (1 – 5 ммоль/л (норма), 2 – 20 ммоль/л) на процес виходу з інактивації. Реєстрації інтегральних калієвих струмів отримані при двох послідовних «прямокутних» зміщеннях мембранного потенціалу від -80 мВ (підтримуваний потенціал) до $+20$ мВ тривалістю кожного 1 с. Проміжок між ними був 0,5 с

них змін зовнішньоклітинного входу селективного фільтра калієвих каналів, зумовлених зміною $[K^+]_o$, використовували блокування калієвих каналів зовнішньоклітинними іонами ТЕА. Нами було встановлено, що зміни $[K^+]_o$ викликали певний вплив на локус зв'язування ТЕА і перебіг його блокуючої дії. На рис. 3 наведено залежність нормованої калієвої провідності мембрани клітин РС-12 від $[K^+]_o$ при наявності у зовнішньоклітинному розчині 3 ммоль/л ТЕА та мембранному потенціалі -10 та $+20$ мВ. При збільшенні $[K^+]_o$ ефективність блокування інтегрального калієвого струму зовнішньоклітинним ТЕА зростала, сягаючи максимуму при $[K^+]_o$ близько 20 ммоль/л. Подальше збільшення $[K^+]_o$ зменшувало ефективність дії ТЕА. Важливо відмітити потенціалзалежність цього ефекту. Така поведінка може розглядатися як наслідок взаємодії проникних іонів з селективним фільтром, що призводить до конформаційних змін місця зв'язування ТЕА і модулювання його спорідненості та конкуренції іонів калію і ТЕА за зовнішній вхід селективного фільтра.

Наші результати дозволяють зробити висновок, що селективний фільтр калієвих

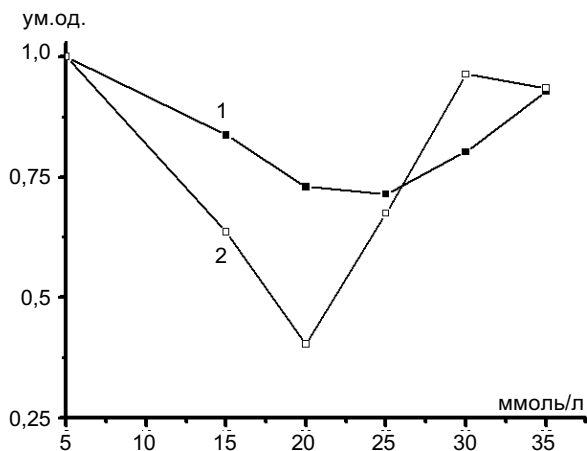


Рис. 3. Модулювання ефективності блокування калієвої провідності зовнішньоклітинним ТЕА (3 ммоль/л) підвищеною зовнішньоклітинною концентрацією іонів калію та змінами мембранного потенціалу (мВ): 1 – -10 , 2 – $+20$

каналів є складовою частиною механізму повільної інактивації, саме тут локалізовано місце впливу іонів калію на конформацію калієвих каналів.

Модуляція властивостей калієвих каналів проникними іонами може виконувати захисні функції в клітині, обмежуючи накопичення іонів калію в зовнішньоклітинному просторі і забезпечує адекватність відповіді нейрона на стимул.

N.Y. Boiko, V.V. Kucher, N.Ch. Pogorelaya,
I.S. Magura

CHANGES IN EXTRACELLULAR K^+ CONCENTRATION MODULATE PROPERTIES OF VOLTAGE-DEPENDENT K^+ CONDUCTANCE IN PC-12 CELLS

The complex processing and integration of signals observed in neurons are facilitated by the diverse range of gating properties of the ion channels in this cell type, particularly the voltage-gated K^+ channels (K_v). A distinctive combination of K^+ channels endows neurons with a broad repertoire of excitable properties and allows each neuron to respond in a specific manner to a given input at a given time. The properties of many K^+ channels can be modulated by second messenger pathways activated by neurotransmitters and other stimuli. K^+ channels are among the most frequent targets of the actions of several signalling systems.

A.A. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Aldrich R.W., Getting P.A., Thompson S.H. Mechanisms of frequency dependent broadening of molluscan neurone soma spikes // *J. Physiol.* – 1979. – **291**. – P. 531–544.
2. Armstrong C.M., Hille B. Voltage gated ion channels and electrical excitability // *Ibid.* – 1998. – **20**. – P. 371–380.
3. Baukrowitz T., Yellen G. Modulation of K^+ current by frequency and external $[K^+]_o$: a tale of two inactivation mechanisms // *Neuron.* – 1995. – **15**. – P. 951–960.
4. Breitwieser G.E. Mechanisms of K^+ channel regulation // *J. Membrane Biol.* – 1996. – 152. – P. 1–11.
5. Greene L.A., Tischler A.S. PC12 pheochromocytoma cultures in neurobiological research // *Adv. Cell. Neurobiol.* – 1982. – **3**. – P. 373–414.
6. Karşchin A. G-protein regulation of inwardly rectifying K^+ channels // *News Physiol. Sci.* – 1999. – **14**. – P. 215–220.

7. Loboda A., Melishchuk A., Armstrong C. Dilated and defunct K channels in the absence of K^+ // Biophys. J. – 2001. – **80**. – P. 2704–2714.
8. Salkoff L., Baker K., Butler A. An essential “set” of K^+ channels conserved in flies, mice and humans // Trends in Neurosciences – 1995. – **18**. – P. 161–166.
9. Sherrington C.S. The Integrative Action of the Nervous System. – New Yfwen, NJ: Yale University Press, 1906.
10. Toro L., Wallner M., Meera P., Tanaka Y. Maxi-K_v, a unique member of the voltage-gated K channel superfamily // News Physiol. Sci. – 1998. – **13**. – P. 112–117.
11. Whim M.D., Kaczmarek L.K. Heterologous expression of the K_v 3.1 potassium channel eliminates spike broadening and the induction of a depolarizing afterpotential in the peptidergic bag cell neurons // J. Neurosci. – 1998. – **18**. – P. 9181–9191.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України,
Київ*

*Матеріал надійшов до
редакції 00.06.2004*