

О.А. Федоренко, Т.М. Волкова, С.М. Марченко

Новий катіонний канал ядерної мембрани Т-лімфоцитів

В настоящее время отсутствуют данные про свойства ионных каналов внутренней мембраны ядра лимфоцитов, хотя транспортная система между цитоплазмой и кариоплазмой имеет большое значение для сложной генетической регуляции, которая происходит в этих клетках. Используя метод patch-clamp мы исследовали ионные каналы на внутренней мембране изолированных ядер культивированных Т-лимфоцитов. Наши исследования показали, что на внутренней мембране находятся анионные (370 пСм) и катионные (152 пСм) каналы. Последние характеризуются относительно быстрой кинетикой, сильно флуктуируют, они почти всегда открыты и инактивируются при больших негативных потенциалах. Каналы проницаемы для K^+ и Na^+ , но не проницаемы для Cl^- . Таким образом, мы впервые зарегистрировали наличие катионселективных каналов на ядерной мембране Т-лимфоцитов. Физиологическая роль этого явления полностью пока не установлена, но можно предположить, что эти каналы могут играть важную роль в поддержании ионного баланса между цитоплазмой и люмином эндоплазматического ретикулума клетки.

ВСТУП

В еукаріотних клітинах ядро має оболонку, яка складається з двох окремих – зовнішньої та внутрішньої – ядерних мембран, що відокремлені порожниною, перинуклеарним простором, котрий є аналогом люмену ендоплазматичного ретикулума [9]. Обидві мембрани пронизані ядерними порами, через які здійснюється пасивна дифузія іонів і молекул з молекулярною масою меншою від 20–40 кДа та високоселективний активний транспорт макромолекул – протеїнів і нуклеїнових кислот [6]. Зовнішня та внутрішня ядерні мембрани мають певні біохімічні та функціональні відмінності. Так, зокрема, зовнішня мембрана за структурою та функційними особливостями схожа до саркоендоплазматичного ретикулума, і містить Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазу, яка відповідає за активний транспорт іонів кальцію [4]. Внутрішня мембрана тісно взаємодіє з нуклеоскелетом (ламінами А, В і С) через

рецептор до ламіну В, через протеїни LAR 1 і 2 та через емерин [2]. Електрофізіологічні властивості ядерної оболонки почали досліджувати ще у 60-ті роки. Нині є праці, які підтверджують існування ядерних іонних каналів у деяких тканинах ссавців, зокрема у серці, печінці, мозку та підшлунковій залозі, а також у клітинах рослин. Незважаючи на згадані вище дослідження, нема певних даних з біофізичних, фармакологічних, молекулярних властивостей цих іонних каналів і нез'ясовано їх фізіологічне значення.

У цій роботі ми досліджували іонні канали ядерної мембрани Т-лімфоцитів. Останні відповідають за клітинну імунну відповідь. Для виконання складних функцій лімфоцитів у них повинна існувати досконала система внутрішньоклітинної сигналізації, в якій на першому місці знаходиться взаємозв'язок клітинної поверхні з її ядром [7]. Але незважаючи на актуальність цього питання, нині мало що відомо про тран-

© О.А. Федоренко, Т.М. Волкова, С.М. Марченко

спортні системи між цито- та каріоплазмою. Отже, дослідження транспортних систем, зокрема іонних каналів внутрішньої ядерної мембрани та їх властивостей, має велике значення у розумінні регуляції функцій Т-лімфоцитів.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на культурі Т-лімфобластів. Культура клітин є дуже зручним об'єктом дослідження через свою однорідність. Тобто всі ядра, які ми отримували під час їх ізоляції, були ядрами саме Т-клітин без будь-яких домішок.

У дослідах використовували лейкомічні Т-лімфобласти людини лінії Jurkat (субклон JMP). Клітини культивували у живильному середовищі RPMI 1640 при наявності таких компонентів: 2 ммоль/л глутаміну, 10% ембріональної телячої сироватки, пеніциліну 100 од/мл і стрептоміцину 50 мкг/мл (усі реактиви фірми "Sigma", США). Клітинну культуру вирощували при 37°C в атмосфері 5 % CO₂ і 95 % повітря. У дослідах використовували Т-лімфобласти зі щільністю 3–9·10⁵ клітин/мл у стадії утворення клітинних агрегатів.

Клітини культури центрифугували протягом 7 хв при швидкості обертання 1500 хв⁻¹ і поміщали в розчин, що містив (ммоль/л): глюконат калію – 150, HEPES – 2,5, HEPES-K – 2,5; рН 7,2. До розчину додавали суміш інгібіторів протеаз ("Roche", Німеччина), після чого клітини заморожували при –20°C. Безпосередньо перед дослідженнями зразки розморожували та піпетували через голку діаметром 0,45 мм, після чого ядра були придатні для досліджень властивостей зовнішньої ядерної мембрани.

Для реєстрації струмів від внутрішньої мембрани ядра інкубували в 1%-му розчині цитрату протягом 40 хв з додаванням 5 ммоль/л діетилтретолу. Оброблені цитратом натрію ядра втрачали свою зовнішню ядерну мембрану, таким чином внутрішня

мембрана ставала доступною для patch-clamp реєстрацій [5].

Реєстрацію іонних каналів проводили у конфігурації nucleus-attached або excised patches у режимі фіксації потенціалу за методом patch-clamp при кімнатній температурі. Індиферентний електрод Ag–AgCl був сполучений з робочою камерою через агаровий місток. Контрольний зовнішньоклітинний (базовий) розчин містив (ммоль/л): KCl – 150, HEPES – 2,5, HEPES-K – 2,5; рН 7,2. Піпетки для реєстрації були виготовлені з боросилікатного скла ("Sutter Instruments", США). Їх опір варіював від 5 до 12 МОм.

Піпетки заповнювали контрольним зовнішньопіпетковим розчином, який для дослідження провідності каналу заміщали на натрійвмісний (ммоль/л) – NaCl – 150, HEPES – 2,5, HEPES-K – 2,5; рН 7,2 або кальційвмісний (ммоль/л) – CaCl₂ – 100; HEPES – 2,5; HEPES-K – 2,5; рН 7,2.

Реєстрацію результатів проводили за допомогою підсилювача Visual Patch VP-500 ("Bio-Logic", Франція). Сигнали з підсилювача фільтрували низькочастотним фільтром Беселя (2 кГц), оцифровували з частотою 10 кГц і зберігали на жорсткому диску комп'ютера. Отримані результати були проаналізовані за допомогою програми pClamp 9.0 ("Axon Instruments", США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати, отримані під час реєстрації іонних струмів від зовнішньої мембрани, показали, що на ній знаходяться аніонні та відсутні катіонні канали, що цілком відповідає попереднім дослідженням [3].

За зазначених умов у наших дослідах були зареєстровані канали двох типів, які відрізнялися за своєю провідністю, селективністю та кінетикою. Перший тип каналів мав провідність 370 пСм у симетричному розчині KCl, другий канал – 152 пСм і за своєю кінетикою він був значно повільнішим за перший канал.

Перший тип каналів ми визначили як аніонний. Канали у наших дослідах за кінетичними характеристиками та наявністю чотирьох чітко розрізнявальних підрівнів, які мали рівні амплітуди, були дуже схожі на хлорні канали, що були зареєстровані у Jurkat на зовнішній ядерній мембрані [3], але відрізнялися від них за провідністю. Автори віднесли ці канали до гомологів внутрішньоклітинних Cl⁻-каналів і припустили, що наявність аніонних каналів на ядерній мембрані та відсутність катіонних лежить в основі функціональної відмінності між Т- та В-лімфоцитами [3].

Другий канал, який ми зареєстрували, різко відрізнявся за характером своєї активності від аніонного каналу і очевидно являв собою новий, раніше не описаний в ядрах лімфоцитів, іонний канал. Тому ми досліджували його більш детально. Канал мав досить швидку кінетику та інактивувався при великих від'ємних потенціалах (-60 мВ і більше). Більшість часу він перебував у відкритому стані та сильно

флуктував, характеризувався вхідним випрямленням (рис.1). Для визначення селективності каналу ми замінили K⁺ у внутрішньопіпетковому розчині на великий органічний катіон N-метил-D-глюкамін (NMDG). За таких умов, коли зовні піпетки знаходився стандартний розчин KCl, реєструвалися поодинокі канали вхідного струму, які не реверсували в діапазоні від -80 до 40 мВ (рис.2). При аплікації NMDG, тобто у симетричному розчині NMDG, ці струми повністю зникали, але після відмивання у базовому розчині знову з'являлися лише вхідні. Таким чином, цей канал є непроникним для іонів хлору, що й дало нам підставу стверджувати, що досліджений нами іонний канал є катіон-селективним. Для визначення провідності цього каналу для Na⁺ ми замінили KCl у внутрішньопіпетковому розчині на NaCl. Потенціал реверсії струму через поодинокі канали в цих умовах змінювався несуттєво порівняно з реєстраціями у симетричному розчині KCl та становив -3,5 мВ (рис.3). Зважаючи

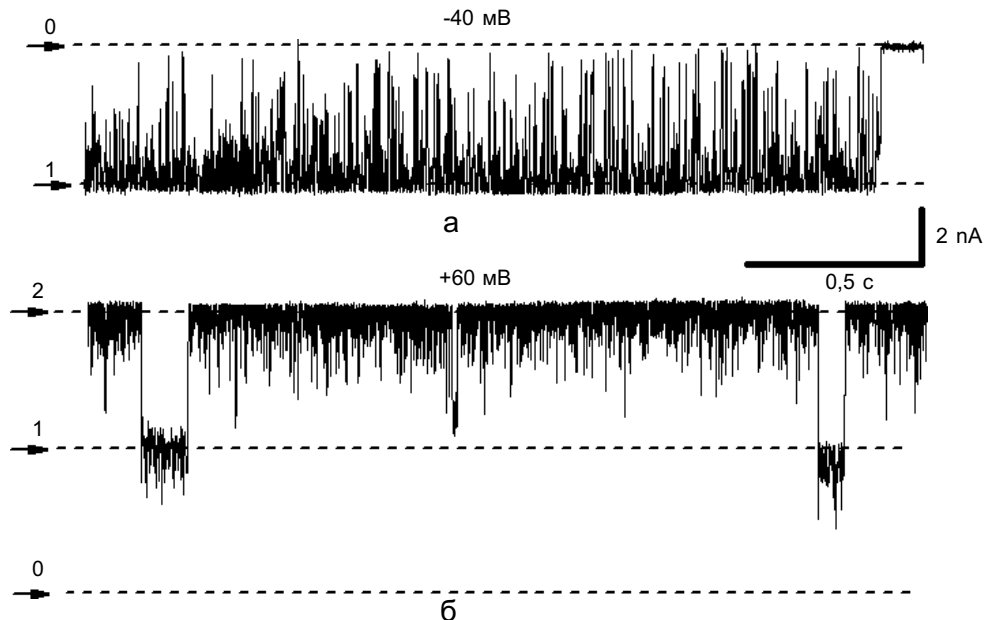


Рис. 1. Реєстрації катіонного каналу в симетричному 150 ммоль/л KCl. Пунктирною лінією показано відкритий і закритий стани каналу, цифри біля стрілочок вказують на кількість відкритих каналів. Амплітуди струмів при -40 мВ та +60 мВ є рівними, що підтверджує, що цей канал має вхідне випрямлення: а – вхідний струм через поодинокий канал, який майже весь час знаходиться у відкритому стані та сильно флуктує; б – вихідний струм через поодинокі канали, яких у даній реєстрації щонайменше два

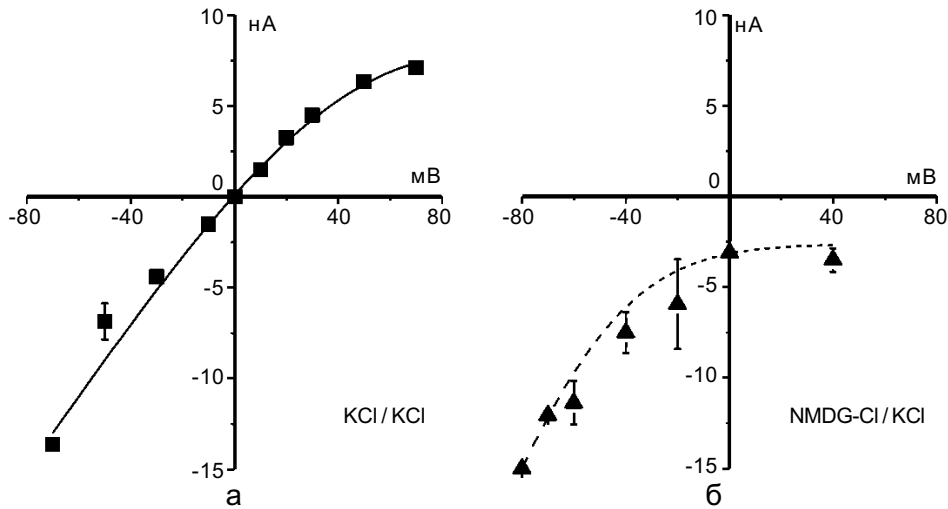


Рис. 2. Вольт-амперні характеристики при різних внутрішньопіпеткових розчинах: а – стандартний базовий розчин (150 ммоль/л KCl); б – розчин, в якому KCl був еквімолярно замінений на NMDG-Cl; зовні піпетки в обох випадках знаходився базовий розчин

на зовсім незначну різницю у потенціалі реверсії каналу при калій- та натрій-вмісному внутрішньопіпетковому розчині,

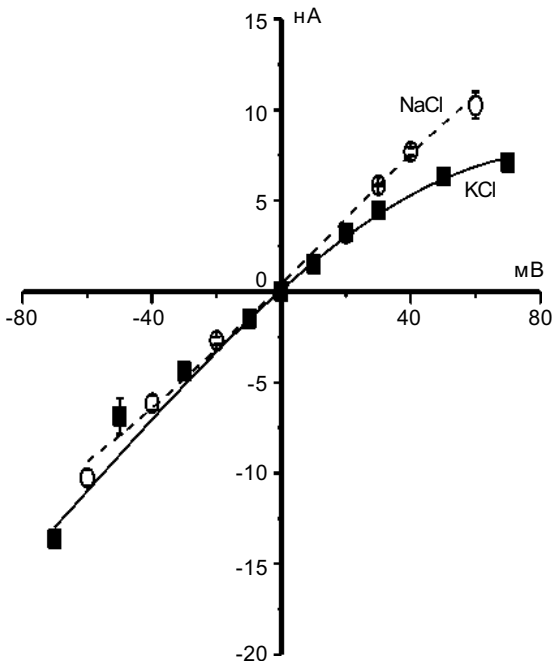


Рис. 3. Вольт-амперні характеристики при різних внутрішньопіпеткових розчинах: безперервна лінія – стандартний базовий розчин (150 ммоль/л KCl); пунктирна лінія – розчин, в якому KCl був еквімолярно замінений на NaCl; зовні піпетки в обох випадках знаходився базовий розчин

можна стверджувати, що цей канал є практично однаково провідний як для K^+ , так і для Na^+ .

Ми намагалися визначити чи є цей канал проникним для двовалентних катіонів, наприклад Ca^{2+} . Для цього ми змінили внутрішньопіпетковий розчин на кальційвмісний. Але, незважаючи на велику кількість спроб ($n > 70$), не вдалося зареєструвати іонні струми при заданих умовах. Це дало нам підставу припустити, що Ca^{2+} може блокувати такі канали.

Залишається не визначеною фізіологічна роль катіонселективних іонних каналів на внутрішній ядерній мембрані. Канали, які проникні для K^+ та інших моновалентних катіонів, але непроникні для Ca^{2+} були знайдені на ядерній мембрані нейронів Пуркінє [5], а також схожі канали були описані для мембран саркоплазматичного ретикулула клітин багатьох типів [8]. Відомо, що сарко- та ендоплазматичний ретикулуми, а також ядерна оболонка є кальцієвими депо, тому в них повинен бути механізм, який запобігає зміні мембранного потенціалу під час виходу кальцію з цих органел. Таким чином, можна зробити припущення, що канали, які ми описали,

забезпечують потік моновалентних катіонів, який запобігає зміні потенціалу під час транспорту через мембрану інших катіонів, наприклад Ca^{2+} . Крім того, у порожнині ендоплазматичного ретикулула відбувається синтез і модифікації всіх білків клітини, а для їх наступного транспортування велике значення має мембранний потенціал. Також є дані, які свідчать, що зміна внутрішньоклітинної концентрації моновалентних катіонів лежить в основі механізмів апоптозу. Зокрема, було встановлено, що збільшення вмісту іонів натрію спричиняє набухання ядра, а зміни концентрації іонів калію займають провідне положення у контролюванні процесів поширення різноманітних змін у клітині під час апоптозу [1].

Таким чином, дослідження іонних каналів ядерної оболонки дає нам змогу краще зрозуміти процеси, що лежать в основі внутрішньоклітинної сигналізації. Хоча чітко визначення фізіологічного значення наявності на внутрішній ядерній мембрані каналів, які є проникними для моновалентних катіонів, залишається дотепер нез'ясованим.

О.А. Fedorenko, T.M. Volkova, S.M. Marchenko

NEW CATION CHANNEL OF THE T-LYMPHOCYTE NUCLEAR MEMBRANE

There are little data on the properties of ion channels in the inner nuclear membrane of lymphocytes, though the transport system between cytoplasm and karyoplasm is of a great importance for a complex genetic regulation in these cells. Using the patch-clamp technique we have investigated ion channels of the inner membrane of nuclei isolated from cultured T-lymphoblasts. Our research has shown that there are anionic (370 pS) and cationic (152 pS) channels on the inner nuclear

membrane. The latter were characterized by fast kinetics and rapid fluctuations; they had high open probability and were inactivated at large negative potentials. These channels were permeable for K^+ and Na^+ , but impermeable for Cl^- . The physiological role of the channels is not clear, but they may play an important role in the ion balance between the cytoplasm and the lumen of the endoplasmic reticulum of the cell.

O.O. Bogomolets Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Bortner C.D., Cidlowski J.A. Uncoupling cell shrinkage from apoptosis reveals that Na^+ influx is required for volume loss during programmed cell death // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **278**. – P. 39176–39184.
2. Clements L, Manilal S, Love DR, Morris GE. Direct interaction between emerin and lamin A // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2000. – 267. – P. 709–714.
3. Franco-Obergon A., Wang H., Clapham D.E. Distinct ion channel classes are expressed on the outer nuclear envelope of T- and B-lymphocyte cell lines // *Biophys. J.* – 2000. – **79**. – P. 202–214.
4. Gerasimenko O.V., Gerasimenko J.V., Tepikin A.V., Petersen O.H. ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca^{2+} from the nuclear envelope // *Cell.* – 1995. – **80**. – P. 439–444.
5. Marchenko S.M., Yarotsky V.V., Kovalenko T.N. et al. Spontaneously active and InsP_3 -activated ion channels in cell nuclei from rat cerebellar Purkinje and granule neurons // *J. Physiol.* – 2005. – Mar 17.
6. Mazzanti M., Bustamante J.O., Oberleithener H. Electrical dimension of the nuclear envelope // *Physiol. Reviews.* – 2001. – **81**, №1. – P. 1–19.
7. Paul W.E., Seder R.A. Lymphocyte response and Cytokines // *Cell.* – 1994. – **76**. – P. 241–251.
8. Picard L., Cote K., Teijeira J. et al. Sarcoplasmic reticulum K^+ channels from human and sheep atrial cells display a specific electro-pharmacological profile // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2002. – **34**. – P.1163–1172.
9. Worman H.J. Components of the nuclear envelope and their role in human disease // *Novartis Found Symp.* – 2005. – **264**. – P. 35–50.

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

Матеріал надійшов до редакції 20.05.2005