

ОГЛЯДИ

УДК 577.352.33

О.А. Федоренко, С.М. Марченко

Спонтанно активні іонні канали мембран ядерної оболонки

В еукаріотних клітинах генетичний апарат обмежений ядерною оболонкою, яка складається з двох мембран, внутрішньої та зовнішньої, і може розглядатися як специфічна частина ендоплазматичного ретикулума клітини. В ядерних мембранах знаходяться ядерні пори – комплекси, які забезпечують високоселективний транспорт макромолекул і пасивне перенесення іонів і малих молекул. Крім того, у внутрішній та зовнішній мембранах ядерної оболонки були описані іонні канали, селективні до катіонів та аніонів. Фізіологічне значення цих каналів повністю досі не встановлено через їх важкодоступність для прямого електрофізіологічного дослідження, але ми можемо припустити, що вони, ймовірно, відіграють важливу роль у підтриманні іонного балансу між цитоплазмою/нуклеоплазмою та люменом ядерної оболонки. У цьому огляді ми зібрали та проаналізували дані щодо спонтанно активних іонних каналів, які були знайдені в мембранах ядерної оболонки клітин різних типів, що дало нам можливість уперше класифікувати ці канали та припустити їх функційне значення.

Ключові слова: іонні канали, ядерна оболонка, ядерна пора, внутрішньоклітинна сигналізація, кальцієвий сигнал, клітинні депо Ca^{2+} .

ВСТУП

Відомо, що одна з головних характеристик еукаріотної клітини є її компартменталізація. Система внутрішньоклітинних мембранних утворень, основою яких є ендоплазматичний ретикулум (ЕР), відіграє велику роль у нормальному функціонуванні клітини. У клітинних мембранах наявні іонні канали, специфічні за своїми властивостями, які на відміну від іонних каналів цитоплазматичної мембрани залишаються недостатньо вивченими через складності у проведенні електрофізіологічних досліджень безпосередньо на внутрішньоклітинних мембранах, не порушуючи їх нативність.

Генетичний апарат клітини відокремлений від решти цитоплазми специфічною органелою – ядерною оболонкою, котру розглядають як частину ЕР, оскільки її зовнішня мембрана та перинуклеарний

простір морфологічно зв'язані з мембраною та люменом ЕР, а також мають спільні біохімічні властивості [5, 6]. Було показано, що ядерна оболонка, як і ЕР, може функціонувати як кальцієве депо [33, 36, 42].

Ядерна оболонка, безперечно, є найбільшою цистерною ЕР. Великий розмір робить її єдиною частиною ЕР в клітинах ссавців, придатною для прямих patch-clamp-реєстрацій. Таким чином, мембрани ядерної оболонки можна використовувати для дослідження іонних каналів решти ЕР.

Досить суперечливим залишається питання щодо функції іонних каналів ядерної оболонки. Вважають, що вони відповідають за підтримання сталої концентрації різних іонів у перинуклеарному просторі та нуклеоплазмі під час певних фізіологічних станів протягом функціо-

© О.А. Федоренко, С.М. Марченко

нальної активності клітини. Усі ядерні іонні канали, які на цей час були описані в літературі, демонструють різні біофізичні властивості, проте фізіологічне значення такого різноманіття каналів залишається незрозумілим. Отже, дослідження іонних каналів ядерної оболонки представляє інтерес у декількох відношеннях. По-перше, вони можуть брати активну участь у регуляції транспорту між цитоплазмою та нуклеоплазмою, а також генетичного апарату клітини. По-друге, ці іонні канали ядерної оболонки можна розглядати як канали ER.

Дослідження іонних каналів ядерної оболонки має насамперед велике теоретичне значення, оскільки сприяє більш глибокому розумінню механізмів внутрішньоклітинної регуляції, зокрема передачі клітинних сигналів всередину ядра, що спричиняє зміни в активності генетичного апарату. Ці дослідження дають підставу для подальшого вивчення властивостей ядерної оболонки та її зв'язку з такими фізіологічними явищами в клітині, як апоптоз, нейродегенерація тощо.

Ми спробували зібрати всі відомі дані щодо іонних каналів ядерних мембран, які були знайдені в клітинах різних типів, та пояснити їх значення у нормальному функціонуванні клітини.

Особливості будови та функціонування ядерної оболонки клітини. Ядерна оболонка – специфічна органела, яка формується внаслідок розширення та злиття цистерн ER таким чином, що навколо ядра утворюється подвійна стінка. Ця структура характерна для всіх еукаріотних клітин. Ядерна оболонка складається із зовнішньої та внутрішньої мембран, які розділені люменом, або перинуклеарним простором, завширшки 20–60 нм. Мембрани ядерної оболонки в морфологічному відношенні не відрізняються від решти внутрішньоклітинних мембран: вони мають товщину близько 7 нм і складаються з двох осміофільних шарів.

Ядерна оболонка не лише обмежує

генетичний матеріал клітини, вона є напівпроникним бар'єром між цитоплазмою та нуклеоплазмою. Транспорт крізь ядерну оболонку забезпечують численні комплекси ядерної пори (NPC). Через ці комплекси здійснюється пасивна дифузія іонів і молекул з молекулярною масою менше ніж 40 кДа [31], а також високоселективний активний транспорт макромолекул – нуклеїнових кислот і протеїнів [2, 37, 39]. Крім того, в зовнішній і внутрішній ядерних мембранах були виявлені іонні канали, що демонструють різні біофізичні властивості залежно від типу клітин, в яких вони були знайдені.

Зовнішня та внутрішня мембрани ядерної оболонки мають певні біохімічні та функціональні відмінності [25, 36, 60]. Морфологічні дослідження показали, що зовнішня ядерна мембрана є продовженням ER [6, 25, 35, 61]. Ця мембрана, як і сарко/ендоплазматичний ретикулум, містить Ca^{2+} -АТФазу, яка відповідає за активний транспорт іонів кальцію [32]. Внутрішня мембрана тісно взаємодіє з нуклеоскелетом (ламінами А, В і С) через рецептор до ламіну В, а також LAP1- і 2-протеїн та емерин [53, 61, 62], мутації яких призводять до важких спадкових хвороб [8]. До того ж, як показали нещодавні дослідження, набір іонних каналів у внутрішній і зовнішній мембранах ядерної оболонки суттєво відрізняється [25, 36, 16–19]. Крім того, ядерна оболонка, так само як і ER, вважається кальцієвим депо, з якого під час певних фізіологічних явищ (збудження) вивільнюється Ca^{2+} [4, 24, 33, 36, 44, 46, 51, 54]. Перші дослідження, які підтверджують це припущення були проведені на ізольованих ядрах клітин печінки [42]. Автори показали, що ці ядра можуть акумулювати Ca^{2+} АТФ-залежним чином і виділяти його при аплікації інозитолтрифосфату.

Отже, ядерна оболонка клітини виконує не лише структурну функцію, а також бере активну участь у внутрішньоклітинній сигналізації.

Комплекс ядерної пори – функціональна та структурна одиниця оболонки ядра клітини. Дослідження з використанням електронної мікроскопії показали наявність у ядерній оболонці дуже характерних утворень – ядерних пор, які пронизують обидві ядерні мембрани [29, 37, 39]. В ядерній порі зовнішня та внутрішня мембрани зливаються, внаслідок чого сполучаються цитоплазма та нуклеоплазма, утворюючи канал діаметром близько 90 нм [20, 35]. У цьому каналі знаходиться NPC, який являє собою величезну надмолекулярну структуру масою понад 125 МДа та складається з понад 100 окремих білкових молекул – нуклеопоринів [35]. У клітинах хребетних виявлено більш ніж 30 різних нуклеопоринів, з яких більшість розчинна і лише 2 білки інтегровані у мембрану. В NPC представлено 8–24 копії кожного з цих білків [34, 49, 50]. У складі більшості нуклеопоринів наявні так звані FG-повтори, збагачені на залишки фенілаланіну та гліцину, які необхідні для зв'язування з рецепторами (специфічними для ядерного імпорту та експорту) і забезпечують транспортування молекул крізь ядерну оболонку.

Складний комплекс пор має октагональну симетрію та включає три ряди гранул розміром близько 25 нм, по 8 штук у кожному – три головні кільця, які укладені одне під одним [1, 29, 59]. Один ряд лежить з боку нуклеоплазми, другий – з боку цитоплазми, третій – розташований в центральній частині пори [43, 50]. Центральне, або люменальне, кільце має 8 випинів, що оточують центральне ядро структури, в якому знаходиться сам канал цього комплексу. Дослідження електронної та флуоресцентної мікроскопії показали, що діаметр внутрішнього каналу ядерної пори приблизно 6 нм, а довжина близько 15 нм [1, 26]. Від цитоплазматичного кільця відходять 8 виростів у цитоплазму, а 8 виростів нуклеоплазматичного кільця утворюють кошикоподібну структуру, яка сполучається з

нуклеоскелетом [22, 27]. Таким чином, NPC бере участь в організації структури ядра.

Під час поділу клітини NPC розпадаються на окремі нуклеопорини, які поширюються на всю клітину [34]. Вважається, що розпад NPCs супроводжується фосфорилуванням деяких білків ядерної пори. Після руйнування ядерної оболонки окремі нуклеопорини збираються в певні скупчення, які можна спостерігати у цитоплазмі. Формування NPCs при утворенні нової ядерної оболонки після розподілу клітини не потребує синтезу нових протеїнів, оскільки компоненти комплексів ядерних пор збираються відразу ж після мітозу [23].

Щільність ядерних пор залежить від типу клітини, її фізіологічного стану та метаболічної активності [39]. Так, наприклад, у гепатоцитах щільність NPC становить приблизно 10–15 пор на 1 мкм² [55], у нейронах Пуркінє – 19–25 пор на 1 мкм², в олігодендроцитах – 5–7 пор на 1 мкм². Загальна кількість ядерних пор на одне ядро нейрона варіює від 18451 ± 2336 (у нейронах Пуркінє) до 621 ± 394 (у гранулярних нейронах). У гліальних клітинах щільність ядерних пор на одне ядро дещо нижча і становить від 1782 ± 162 (у протоплазматичних астроцитах) до 402 ± 67 (в олігодендроцитах) [23].

Є дані, що інколи ядерні пори можуть утворювати кластери з двох чи більше NPC. У нейронах Пуркінє такі кластеризовані комплекси ядерних пор становлять 82 % від загальної кількості пор в ядерній оболонці, а в інтернейронах – 44 % [23]. Фізіологічне значення цього явища залишається нез'ясованим.

Через NPCs здійснюється двобічне перенесення іонів і молекул між цитоплазмою та нуклеоплазмою, яке може бути двох видів – активний і пасивна дифузія. За рахунок активного транспорту крізь ядерні пори проникають нуклеїнові кислоти та протеїни; для цього використовується енергія гідролізу ГТФ за наявності Ran, яка

є Ras-спорідненою ГТФазою [29]. Крім того, білки, які переносяться в ядро повинні мати специфічні сигнальні послідовності, так само й молекули, які з ядра повинні потрапити у цитоплазму [13, 57]. Нині відомо безліч ядерних сигнальних послідовностей різних білків тварин, дріжджів і рослин, які впізнаються специфічними транспортними рецепторами, що зв'язуються з NPC [29, 37].

Пасивно крізь ядерну пору можуть проникати молекули масою до 40 кДа та іони [31]. Хоча за традиційною точкою погляду NPCs не перешкоджають пересуванню іонів з цитоплазми у ядро і навпаки, останні дослідження показали, що ядерні пори таки створюють бар'єр для вільної дифузії. Так вивільнення Ca^{2+} з ядерної оболонки може модулювати пасивний транспорт через NPC [54, 58].

Деякі науковці висловлюють припущення, що у NPC крім центрального каналу пори, через який здійснюється активний транспорт та пасивна дифузія, є й інші додаткові периферичні канали, які забезпечують рух неорганічних іонів (K^+ , N^+ , H^+ , Ca^{2+} та Cl^-) всередину чи назовні ядра навіть під час транспорту через NPC великої молекули, яка може закривати центральну пору комплексу. Ці канали, ймовірно, є АТФ- та Ca^{2+} -залежними [39, 52].

Морфологічні та функціональні дослідження, які проводили різні групи вчених, показали тісний зв'язок між іонними каналами ядерної мембрани та ядерною порою [9–12, 38, 39]. Електронно-мікроскопічні дослідження показали наявність восьми малих периферичних каналів, які розташовуються навколо центральної пори NPC [52]. Було показано, що кількість іонних каналів, зареєстрованих за допомогою методу patch-clamp у клітинах деяких типів, може збігатися з кількістю NPC [38, 56]. Крім того, було зроблено припущення, ніби ці дві транспортні системи (крізь центральну пору та периферичні

канали), незважаючи на свою фізичну відокремленість, можуть взаємно впливати одна на одну, проте механізми цього впливу залишаються нез'ясованими. Всі ці дані навели на думку, ніби іонні канали дійсно входять до складу NPC. Але це твердження спростовують праці інших науковців [18, 25, 36].

Отже, NPC – не лише головна структурна складова ядерної оболонки, він є основною сполучною ланкою між цитоплазмою та нуклеоплазмою, транспорт через яку характеризується високою селективністю.

Іонні канали мембран ядерної оболонки клітини. Електрофізіологічні властивості ядерної оболонки почали досліджувати ще у 60-ті роки, проте вперше зареєструвати поодинокі іонні канали вдалося значно пізніше [38]. Виявилось, що крім ядерних пор, через які відбувається ядерно-цитоплазматичний транспорт, у зовнішній та внутрішній мембранах ядерної оболонки наявні іонні канали, які сполучають цитоплазму із перинуклеарним простором. За останній час з'явилася низка праць, які підтверджують існування ядерних іонних каналів у багатьох типах клітин [3, 14–19, 21, 25, 36, 38, 39, 48].

Для досліджень властивостей поодиноких іонних каналів ядерних мембран використовують ізольовані ядра [3, 15, 36], а також протеоліпосоми [25] чи плоскі ліпідні бішари [40, 48] зі вбудованими в них ядерними мембранами. За допомогою певних методичних підходів можна досліджувати внутрішню та зовнішню ядерні мембрани та їх іонні канали окремо [36, 37, 48]. Проте єдиним методом, який дає змогу досліджувати ядерні іонні канали у їх нативному стані, є використання ізольованих ядер [16–19].

Під час реєстрації поодиноких каналів у внутрішньоклітинних мембранах було виявлено багато іонних каналів різних типів. Частина з них не потребує для своєї

активації жодних стимулів, і тому такі канали називаються спонтанно активними іонними каналами. Серед них розрізняють катіонні та аніонні канали, які відрізняються за своїми біофізичними властивостями та фізіологічним значенням.

Першими з іонних каналів, які вдалося зареєструвати на мембранах ядерної оболонки, були калійселективні канали з багатьма рівнями провідності, максимальна з яких становила 200 пСм [38].

Нині вже є велика кількість праць, в яких, використовуючи електрофізіологічні методи, були описані мало селективні катіонні канали на внутрішніх мембранах клітин. Однак вони не були виділені та клоновані, адже досі не знайдено їх блокатори чи інші молекули, за допомогою яких ці канали можна ідентифікувати поза мембраною.

Ядерні мембрани нейронів Пуркінє містять катіонний канал з великою провідністю ($198 \text{ пСм} \pm 27 \text{ пСм}$ у симетричному розчині KCl). Цей канал є мало селективним до одновалентних катіонів ($P_{\text{Na}}/P_{\text{K}}=0,65$) та не пропускає двовалентні катіони (Ca^{2+} , Ba^{2+}). Відомі модулятори катіонних каналів (тетраетиламоній, амінопіридин, рутеніум ред, ріанодин, гепарин, La^{3+} , АТФ, Mg^{2+}) не мають жодного впливу на ці канали, і лише Ca^{2+} та Ba^{2+} у дуже високих концентраціях (100 ммоль/л) пригнічують їх активність [36]. Автори припускають, що ці канали необхідні для підтримання іонного балансу під час вивільнення Ca^{2+} з ядерної оболонки в ядрах цих нейронів.

У внутрішній мембрані ядер пірамідальних нейронів CA1-ділянки у симетричному розчині 150 ммоль/л KCl були зареєстровані канали з провідністю 220–260 пСм [17]. Як показали досліди, в розчині KCl/трис-Cl, це катіонні канали, які за своїми кінетичними властивостями та провідністю близькі до мало селективних катіонних каналів, що були описані раніше

в ядрах нейронів Пуркінє мозочка щура. Частота відкритого стану каналів ядер нейронів мозочка була також потенціалзалежна, при великих позитивних потенціалах (більше ніж +60 мВ) канали майже весь час були відкриті, а при великих негативних потенціалах (-60 мВ та нижче) закривалися [36]. Отже, катіонні канали у внутрішній мембрані ядер нейронів CA1-ділянки гіпокампа мають більшу чутливість до зміни мембранного потенціалу, адже вони повністю пригнічуються при менших негативних потенціалах (-40 мВ). Ці канали, ймовірно, беруть участь у регуляції кальцієвого сигналу, і розбіжність у потенціалзалежності може означати, що вони по-різному регулюються. Зокрема, більша чутливість до негативних потенціалів може означати, що викид Ca^{2+} з ядерної оболонки в гіпокампі має меншу тривалість.

АТФ-залежні калієві канали були знайдені на ядрах в-клітин підшлункової залози миші. Ці канали активуються АДФ та блокуються АТФ у підвищених (мілімолярних) концентраціях. Було показано, що блокування цих каналів призводить до збільшення концентрації Ca^{2+} в ядрі, внаслідок чого активується фактор транскрипції CREB (від англ. CAMP response element-binding) впливаючи таким чином на експресію генів [47]. Ми таким чином пояснюємо зв'язок між зміною в метаболізмі клітини та її генетичною активністю через активність цих каналів.

До цього часу залишається невизначеним фізіологічна роль катіонселективних іонних каналів у внутрішній ядерній мембрані. Канали, які проникні для K^{+} та інших одновалентних катіонів, але непроникні для Ca^{2+} , що були знайдені в ядерній мембрані нейронів Пуркінє [18, 36], пірамідальних нейронів гіпокампа [17] та Т-лімфоцитах [16]. Схожі канали були описані для мембран саркоплазматичного ретикулула клітин багатьох типів [45].

Відомо, що саркоплазматичний та ендоплазматичний ретикулуми, а також ядерна оболонка є кальцієвим депо, тому в них повинен бути механізм, який запобігає зміненню мембранного потенціалу під час виходу кальцію з цих органел. Таким чином, можна зробити припущення, що ці канали забезпечують потік одновалентних катіонів, який запобігає змінам потенціалу під час транспорту через мембрану інших катіонів, наприклад Ca^{2+} [63, 64]. Крім того, у порожнині ендоплазматичного ретикулума відбувається синтез і модифікації всіх білків клітини, а для їх подальшого транспортування велике значення має мембранний потенціал.

Також є дані, які свідчать, що зміна внутрішньоклітинної концентрації одновалентних 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 [7].

Іншим типом спонтанно активних іонних каналів виявилися канали, селективні до Cl^- . Хлорні канали у клітинах можуть регулювати кисле середовище у клітинних компартментах та електронейтралізування під час транспорту іонів (H^+ або Ca^{2+}) крізь внутрішньоклітинні мембрани. Крім того, іони хлору відповідають за підтримання сталого тиску (та об'єму) клітини [56].

П'ять основних типів хлорних каналів ідентифіковано на цей час: канали, пов'язані з лігандкерованими рецепторами, а також канали родини CFTR, CIC, CLIC і CLCA. Серед них представники родини CLIC та деякі з CIC експресуються на мембранах внутрішньоклітинних органел, зокрема ендоплазматичного ретикулума, ядерної оболонки, ендосом [14, 30].

Молекулярна структура хлорних каналів була досліджена завдяки клонуванню їх генів, і функції цих каналів були вивчені на

молекулярному рівні. Молекула CIC складається з 18 спіралей, більшість з яких неповністю перетинає мембрану, 9 з них розташовані перпендикулярно до поверхні мембрани. Канал має вигляд ромба розміром $10 \times 5,5 \times 6,5$ нм та випинає з обох боків мембрани [30].

Всі CIC-канали є гомодимерами. Аналіз тривимірної структури вказує на наявність двох однакових субодиниць, які контактують між собою на великій площі, що містить по чотири спіралі від кожної з цих субодиниць. Ті CIC-канали, які були досліджені на рівні одного каналу (CIC-0, CIC-1 та CIC-2) демонстрували два чітких рівні за амплітудою рівня провідності, що вказувало на наявність у молекулі каналу двох ідентичних пор з окремими селективними фільтрами (послідовність селективності яких: $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$). Кристалографічний аналіз підтвердив це спостереження. Більшість каналів CIC демонструють чітку потенціалзалежність, крім того, мають подвійний ворітний механізм: по-перше, кожна з пор каналу може закриватися незалежно і швидко (до 10 мс), а потім відкриватися при деполяризації; по-друге, є механізм, який одночасно закриває обидві пори на тривалий час (10 с – 1 хв) та відкриває їх при гіперполяризації [30]. Вважають, що залишок аспартату в домені D1 діє як сенсор напруги. Ворітні механізми каналів залежать не лише від потенціалу, а також модулюються концентрацією аніонів і рН цитоплазми [93]. CIC були знайдені у саркоплазматичному ретикулумі (CIC-1), в ендосомах та синаптичних везикулах (CIC-3), ендоплазматичному ретикулумі (CIC-6), лізосомах (CIC-7) [30], проте, ймовірно, вони можуть бути локалізовані й на інших внутрішньоклітинних мембранах.

Аніонні канали, які були знайдені у внутрішній ядерній мембрані гранулярних нейронів зубчастої звивини [19] та в зовнішній ядерній мембрані Jurkat-клітин [16], ймовірно, належать до родини CIC,

адже ці канали дуже швидко флюктували між двома однаковими за значенням рівнями провідності.

Іншою родиною хлорних внутрішньоклітинних каналів є CLIC. Першим представником цієї родини, який вдалося виділити та клонувати є аніонний канал ядерних мембран клітин коров'ячої нирки р64 [14]. Молекулярна маса цього каналу 64 кДа, складається він з 437 амінокислотних залишків та має лише одну ділянку, що перетинає мембрану [30]. У ядрах моноцитів людини були клоновані внутрішньоклітинні хлорні канали NCC27, або CLIC-1, та CLIC-2. У клітинах ссавців був клонований CLIC-3. Усі ці канали демонструють високу гомологію один до одного. Як і CLIC-1, так CLIC-2, CLIC-3 було визначено на мембрані ядерної оболонки, де вони спричиняють рух аніонів крізь неї [56]. Було показано, що CLIC-3 своїм С-кінцем сполучається з мітогенактивною протеїнкіназою ERK7 (від англ. extracellular signal-regulated kinase 7) і, можливо, бере участь у регуляції росту клітини [14]. CLIC були виявлені майже в усіх тканинах ссавців, але найбільший рівень їх експресії спостерігається в серці, нирках, легенях і скелетних м'язах.

У клітинах людини були знайдені хлорні канали, що не відносились до жодного з цих типів, а саме MCLC (від англ. mid-1-related chloride channel), які локалізувалися головним чином на ендоплазматичному ретикуліумі та апараті Гольджі, хоча у сперматозитах висока їх щільність спостерігалася на мембранах ядерної оболонки, що вказує на участь цих каналів у сперматогенезі. MCLC у цих досліджах мали провідність 70 пСм у симетричному розчині 150 ммоль/л KCl і були більш проникні для аніонів, ніж катіонів ($P_{Cl^-}/P_{K^+}=3,7$). Як показали електрофізіологічні дослідження, ці канали можуть проводити й інші аніони у такій послідовності: $Br^- > Cl^- > F^- > SO_4^{2-}$ [41].

Внутрішньоклітинні хлорні канали мо-

жуть блокуватися Zn^{2+} і Cd^{2+} у мікромольних концентраціях. ClC є малочутливими до таких класичних блокаторів аніонних каналів, як нітрофенілпропіламінбензоат, дифеніламінокарбоксилат і можуть бути заблокованими ними лише у мілімолярних концентраціях. CLIC блокують інданілоксиацетат, дисульфонова кислота та TS-ТМ-каліксарен [30].

Хлорні канали, що були знайдені в мембранах ядерної оболонки різних типів клітин, різко відрізняються за своїми біофізичними властивостями. Ці дані підтверджують наше припущення про те, що в клітинах різних типів експресуються різні набори іонних каналів у мембранах ядерної оболонки. Крім того, навіть у нейронах різних відділів ЦНС вони мають розбіжності. Ця розбіжність у властивостях аніонних каналів ядерних мембран різних типів, імовірно, пов'язана з відмінностями у функціонуванні їх ядерних оболонок, проте достовірного пояснення цього явища на цей час не існує.

Припускають, що аніонні канали в ядерній оболонці необхідні для підтримання між цитоплазмою та перинуклеарним простором іонного балансу, який може суттєво змінюватися під час певних фізіологічних явищ, наприклад звільнення Ca^{2+} з ядерної оболонки, проте це твердження потребує доведення.

Проблеми дослідження спонтанно активних іонних каналів ядерних мембран. Як вже було зазначено, ядерна оболонка є одночасно інтегральною частиною ендоплазматичного ретикуліума та специфічною структурою, яка може регулювати ядерно-цитоплазматичний транспорт. Така подвійність функцій викликає сумніви щодо фізіологічного значення іонних каналів, які знаходяться на ядерній оболонці. По-перше, вони можуть являти собою іонні канали ендоплазматичного ретикуліума. По-друге, у patch-clamp може бути зареєстрована каналоподібна активність ядерних

пор [28, 39, 55]. Таким чином, працюючи з ядерною оболонкою, важливо чітко визначити, чи належать канали, які реєструються, до комплексу ядерної пори.

Щільність ядерних пор у ядерній оболонці клітин різних типів варіює від одиниць до декількох десятків на $1 \mu\text{m}^2$ [23]. Така висока щільність дає підстави припускати, що під час реєстрацій у patch-піпетці може міститися велика кількість ядерних пор. Таким чином, можна очікувати, що опір під час методу patch-clamp буде дуже низьким. Проте насправді з ядерною мембраною може бути встановлений щільний гігаомний контакт [38], завдяки чому низка іонселективних каналів була описана в ядерній оболонці клітин різних типів [15, 21, 25, 36, 41, 48].

Для того, щоб пояснити ці розбіжності у даних, було припущено, що катіонні канали великої провідності (декілька сотень пікосіменсів), які були знайдені у мембранах ядерних оболонок різних типів клітин, являють собою канали комплексів ядерної пори для пасивної дифузії, що, маючи ворітні механізми, можуть поводити себе як звичайні іонні канали. На користь цієї гіпотези виступають деякі вчені [3, 10, 11, 28, 38, 39, 55], проте їх дані викликають деякі сумніви. Так, наприклад, при дослідженні біофізичних властивостей катіонних каналів великої провідності, які являли собою основний тип спонтанно активних іонних каналів, що були зареєстровані в мембранах ядерної оболонки нейронів Пуркінє мозочка, було чітко показано, що вони не можуть бути каналами ядерної пори, хоча рівень їх щільності в мембранах ядер нейронів цього типу відповідає рівню ядерних пор у таких клітинах [36].

Було показано, що катіонні канали великої провідності можуть бути зареєстровані як у зовнішній, так і внутрішній ядерній мембрані. В обох випадках канали мали ідентичну провідність, селективність і кінетику, але дуже відрізнялися за своєю

потенціалзалежністю [18]. Канали у зовнішній ядерній мембрані інгібувалися позитивними потенціалами в patch-піпетці, а у внутрішній – негативними. Ці дані швидше узгоджуються із локалізацією каналів у мембранах, ніж з їх асоціацією із комплексом ядерної пори. Топологічна орієнтація каналів відносно ядерних мембран була ідентична для обох каналів. Ці канали інгібувалися негативним потенціалом всередині ядерної оболонки, що вказує на знаходження сенсорної ділянки їх молекули всередині перинуклеарного простору. Хоча щільність і провідність катіонних каналів відповідають характеристиці каналу дифузійної пори, інші біофізичні властивості катіонних каналів суперечать цьому припущенню [18].

Отже, було надано докази того, що катіонні канали великої провідності не пронизують подвійну ядерну оболонку, проте забезпечують прямий контакт між нуклеоплазмою або цитоплазмою та перинуклеарним простором [18]. Ми припускаємо, що катіонні канали великої провідності можуть належати до іонних каналів ендоплазматичного ретикулума та необхідні для його специфічних функцій. Наприклад, вони можуть брати участь у регуляції вивільнення Ca^{2+} з депо [63, 64].

Досі невідомо, чому не вдається виявити активність каналу ядерної пори за допомогою методу patch-clamp. Одна з можливих причин може бути руйнування цілісності комплексу ядерної пори під час утворення гігаомного контакту. Так, наприклад, було показано, що формування останнього цитоплазматичної мембрани супроводжується значними змінами у структурі цитоскелета. Тому можна припустити, що під час patch-clamp від ядерної мембрани руйнується нуклеоскелет, який має тісний взаємозв'язок з комплексом ядерної пори. Таким чином, молекулярна природа каналу комплексу ядерної пори для пасивної дифузії та його властивості

потребують подальших досліджень.

Підсумовуючи все написане вище, можна підкреслити, що у сучасній літературі є багато інформації, яка стосується структурних і функціональних особливостей ядерної оболонки клітин. Але питанням регуляції ядерно-цитоплазматичного транспорту почали займатися відносно недавно, тому в багатьох роботах присутні досить суперечливі дані. На цей час залишається безліч нез'ясованих питань щодо розуміння яким чином відбувається передача внутрішньоклітинних сигналів всередину ядра, яка роль у цьому належить ядерним порам та іонним каналам ядерних мембран.

Дослідження іонних каналів ядерної оболонки дає нам змогу краще зрозуміти процеси, що лежать в основі внутрішньоклітинної сигналізації. Хоча чітко визначення фізіологічного значення наявності у внутрішній та зовнішній ядерних мембранах спонтанно активних іонних каналів, які є селективними для аніонів та одновалентних катіонів, досі нез'ясоване. Крім того, залишається відкритим питання щодо можливої участі цих каналів у патологічних процесах, які відбуваються в клітині.

Е.А. Федоренко, С.М. Марченко

СПОНТАННО АКТИВНЫЕ ИОННЫЕ КАНАЛЫ МЕМБРАН ЯДЕРНОЙ ОБОЛОЧКИ

В эукариотных клетках генетический аппарат ограничен ядерной оболочкой, которая состоит из двух мембран, внешней и внутренней, и может рассматриваться как специфическая часть эндоплазматического ретикулума клетки. В ядерных мембранах находятся ядерные поры – комплексы, которые обеспечивают высокоселективный транспорт макромолекул и пассивный – ионов и малых молекул. Кроме того, во внутренней и во внешней мембранах ядерной оболочки были описаны ионные каналы с разными свойствами. Физиологическое значение этих каналов полностью пока не установлено из-за их труднодоступности для прямого электрофизиологического исследования, но мы можем предположить, что они могут играть важную роль в поддержании ионного баланса между цитоплазмой/нуклеоплазмой и люменом ядерной оболочки. В этом обзоре мы собрали и проанализировали данные по

спонтанно активным ионным каналам, которые были найдены в мембранах ядерной оболочки клеток разных типов, и постарались предположить их функциональное значение. Ключевые слова: ионные каналы, ядерная оболочка, ядерная пора, внутриклеточная сигнализация, кальциевый сигнал, клеточные депо Ca^{2+} .

O.A. Fedorenko, S.M. Marchenko

SPONTANIOUSLY ACTIVE ION CHANNELS OF THE NUCLEAR ENVELOPE MEMBRANE

The genetic apparatus of the eukaryotic cells is enclosed by the nuclear envelope, which consists of two membranes, the inner and the outer ones, and can be regarded as the specific part of the endoplasmic reticulum of the cell. There are nuclear pores in the nuclear membranes – complexes, which provide the highly selective transport of macromolecules and passive transport of ions and small molecules. Besides, ion channels selective to cations and anions were described in the inner and the outer nuclear membranes. The physiological significance of these channels is not still clear because of the difficulty of access for the direct electrophysiological investigation, but we can suppose that they can play an important role in the ion balance between the cytoplasm/nucleoplasm and the nuclear lumen. In this review we gathered and analyzed data about spontaneously active ion channels which were found in the membranes of the nuclear envelope from cells of different types and tried to propose their functional meaning.

Key words: ion channels, nuclear envelope, nuclear pore, intracellular signaling, calcium signal, Ca^{2+} store of the cell.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Science of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Akey C.W. Structural plasticity of the nuclear pore complex // *J.Mol. Biol.* – 1995. – **248**. – P. 273–293.
2. Allen T.D., Cronshaw J.M., Bagley S., Kiseleva E., Goldberg M.W. The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm // *J. Cell Sci.* – 2000. – **113**. – P. 1651–1659.
3. Assandri R., Mazzanti M. Ionic permeability on isolated mouse liver nuclei: influence of ATP and Ca^{2+} // *J. Membr. Biol.* – 1997. – **157**, № 3. – P. 301–309.
4. Badminton M.N., Campbell A.K., Rembold C.M. Differential regulation of nuclear and cytosolic Ca^{2+} in HeLa cells // *J. Biol. Chemistry.* – 1996. – **271**, № 49. – P.31210–31214.
5. Baumann O., Walz B. Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains // *Int. Rev. Cytol.* – 2001. – **205**. – P. 149–214.
6. Berridge M.J. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signal organelle // *Cell Calcium.* – 2002. – **32**,

- № 5–6. – P. 235–249.
7. 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.
 8. Burke B., Stewart C.L. Life at the edge: the nuclear envelope and human disease // *Nature*. – 2002. – **3**. – P. 575–585.
 9. Bustamante J.O., Liepins A., Hanover J.A. Nuclear pore complex ion channels // *Mol. Membr. Biol.* – 1994. – **11**, № 3. – P. 141–150.
 10. Bustamante J.O., Hanover J.A., Liepins A. The ion channel behaviour of the nuclear pore complex // *J. Membr. Biol.* – 1995. – **146**, №3. – P. 239–251.
 11. Bustamante J.O., Varanda W.A. Patch-clamp detection of macromolecular translocation along nuclear pores // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 1998. – **31**, № 3. – P.333–354.
 12. Bustamante J.O. Current concepts in nuclear pore electrophysiology // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2006. – **84**, № 3–4. – P. 347–365.
 13. Danker T., H. Oberleithner. Nuclear pore function viewed with atomic force microscopy // *Pflug. Arch. – Eur. J. Physiol.* – 2000. – **439**. – P. 671–681.
 14. Debska G., Kicinska A., Skalska J., Szewczyk A. Intracellular potassium and chloride channels: an update // *ABP.* – 2001. – **48**. – P. 137–144.
 15. Draguhn A., Borner G., Beckmann R., Buchber K., Heinemann U., Hucho F. Large-conductance cation channels in te envelope of nuclei from rat cerebral cortex // *J. Membr. Biol.* – 1997. – **158**, № 2. – 159–166.
 16. Fedorenko O.A., Volkova T.M., Marchenko S.M. New cation channel of the T-lymphocyte nuclear membrane // *Фізіол. журн.* – 2006. – **52**, № 1. – P. 17–21.
 17. Fedorenko O.A., Duzhyu D.E., Marchenko S.M. Spontaneous active ion channels of the nuclear envelope membranes of pyramidal hippocampal neurons // *Neurophysiology.* – 2007. – **39**, № 1. – P. 3–8.
 18. Fedorenko O.A., Duzhyu D.E., Marchenko S.M. Nuclear ionic channels of the granule cells from the dentate gyrus // *Фізіол. журн.* – 2007. – **53**, № 3. – P. 9–15.
 19. Fedorenko O.A., Duzhyu D.E., Marchenko S.M. Cationic large conductance channels of the nuclear envelope of Purkinje neurons of cerebellum // *Neurophysiology.* – 2007. – **39**, № 2. – P. 13–18.
 20. Feldherr C.M., Akin D., Cohen R.J. Regulation of functional nuclear pore size in fibroblasts // *J. Cell Sci.* – 2000. – **114**. – P. 4621–4627.
 21. 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.
 22. Gant T.M., Wilson K.L. Nuclear assembly // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 1997. – **13**. – P. 669–695.
 23. Garcia-Segura L.M., Lafarga M., Berciano M.T., Hernandez P., Andrez M.A. Distribution of nuclear pores and chromatin organization in neurons and glial cells of the rat cerebellar cortex // *J. Comp. Neurol.* – 1989. – 290, № 3. – P. 440–450.
 24. 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**, № 3. – P. 439–444.
 25. Guihard G., Proteau S., Payet M.D., Eskande D., Rousseau E. Patch-clamp study of liver nuclear ionic channels reconstituted into giant proteoliposomes // *FEBS Lett.* – 2000. – **476**. – P. 234–241.
 26. Goldberg M.W., Allen T.D. The nuclear pore complex and lamina: three-dimensional structures and interactions determined by field emission in-lens scanning electron microscopy // *J. Mol. Biol.* – 1996. – **257**. – P. 848–865.
 27. Goldberg M.W., Wiese C., Allen T.D., Wilson K.L. Dimples, pores, star-rings, and thin rings on growing nuclear envelopes: evidence for structural intermediates in nuclear pore complex assembly // *J. Cell Sci.* – 1997. – **110**. – P. 409–420.
 28. Innocenti B., Mazzanti M. Identification of a nucleocytoplasmic ionic pathway by osmotic shock in isolated mouse liver nuclei // *J. Membr. Biol.* – 1993. – **131**, № 2. – P. 137–142.
 29. Jaggi R.D., Franco-Obergon A., Ensslin K. Quantative topographical analysis of nuclear pore complex function using scanning force microscopy // *Biophys.J.* – 2003. – **85**. – P. 4093–4098.
 30. Jentsch T.J., Stein V., Weinreich F., Zdebik A.A. Molecular structure and physiological function of chloride channels // *Physiol. Rev.* – 2001. – **82**. – P.503–568.
 31. Keminer O., Peters R. Permeability of single nuclear pore // *Biophys. J.* – 1999. – **77**, № 1. – P. 217–228.
 32. Lanini L., Bachs O., Carafoli E. The calcium pump of the liver nuclear membrane is identical to that of endoplasmic reticulum // *J. Biol. Chem.* – 1992. – **267**, № 16. – P.11548–11552.
 33. Leite M.F., Thrower E.C., Echivarria W., Koulen P., Bennett A.M., Ehrlich B.E., Nathanson M.H. Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently // *PNAS.* – 2003. – **100**, № 5. – P. 2975–2980.
 34. Lenart P., Ellenberg J. Monitoring the permeability of the nuclear envelope during the cell cycle // *Methods.* – 2006. – **38**, № 1. – P. 17–24.
 35. Marelli M., Lusk C.P., Chan H., Aitchison J.D., Wozniak R.W. A link between the synthesis of nucleoporins and the biogenesis of the nuclear envelope // *J. Cell Biol.* – 2001. – **153**, № 4. – P. 709–724.
 36. Marchenko S.M., Yarotsky V.V., Kovalenko T.N., Kostyuk P.G., Thomas R.C. Spontaneously active and InsP₃-activated ion channels in cell nuclei from rat cerebellar Purkinje and granule neurones // *J. Physiol.*

- 2005. – **15**, № 565. – P.897–910.
37. Matzke M., Aufsatz W., Gregor W., van Der Winden J., Papp I., Matzake A.J. Ion transporters in the nucleus? // *Plant Physiol.* – 2001. – **127**. – P. 10–13.
 38. Mazzanti M., DeFelice L.J., Cohn J., Malter H. Ion channels in the nuclear envelope // *Nature.* – 1990. – **22**, № 343(6260). – P. 764–767.
 39. Mazzanti M., Bustamante J.O., Oberleithner H. Electrical dimension of the nuclear envelope // *Physiol. Rev.* – 2001. – **81**, № 1. – P. 1–19.
 40. Minn A.J., Velez P., Schendel S.L., Liang H., Muchmore S.W., Fesik S.W., Fill M., Thompson C.B. Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes // *Nature.* – 1997. – **23**, № 385(6614). – P. 353–357.
 41. Nagasawa M., Kanzaki M., Lino Y., Morishita Y., Kojima I. Identification of a novel chloride channel expressed in the endoplasmic reticulum, Golgi apparatus and nucleus // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**, № 23. – P. 20413–20418.
 42. Nicotera P., Orrenius S., Nilsson T., Berggren P.O. An inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} pool in liver nuclei // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1990. – **87**, № 17. – P. 6858–6862.
 43. Pante N., Aebi U. Molecular dissection of the nuclear pore complex // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* – 1996. – **31**. – P. 153–199.
 44. Petersen O.H., Gerasimenko O.V., Gerasimenko J.V., Mogami H., Tepikin A.V. The calcium store in the nuclear envelope // *Cell Calcium.* – 1998. – **23**, № 2–3. – P.87–90.
 45. Picard L., Cote K., Teijeira J., Greentree D., Rousseau E. Sarcoplasmic reticulum K^{+} channels from human and sheep atrial cells display a specific electropharmacological profile // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 2002. – **34**. – P. 1163–1172.
 46. Pozzan T., Rizzuto R., Volpe P., Meldolesi J. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores // *Physiol. Rev.* – 1994. – **73**, №3. – P. 595–636.
 47. Quesada I., Rovira J.M., Martin F., Roche E., Nadal A., Soria B. Nuclear K^{+} channels trigger nuclear Ca^{2+} transients that modulate ^{ATP} nuclear function // *PNAS.* – 2002. – **99**, № 14. – P. 9544–9549.
 48. Rousseau E., Michaud C., Lefebvre D., Proteau S., Decrouy A. Reconstitution of ionic channels from inner and outer membranes of mammalian cardiac nuclei // *Biophys. J.* – 1996. – **70**, № 2. – P. 703–714.
 49. Rout M. P., Aitchison J. D., Suprpto A., Hjertaas K., Zhao Y., Chait B.T. The yeast nuclear pore complex: composition, architecture and transport mechanism // *J. Cell Biol.* – 2000. – **148**. – P. 635–651.
 50. Ryan K.J., Wente S.R. The nuclear complex: a protein machine bridging the nucleus and cytoplasm // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2000. – **12**. – P. 361–371.
 51. Santella L., Garafoli E. Calcium signaling in the cell nucleus // *FASEB J.* – 1997. – **11**. – P. 1091–1109.
 52. Shahin V., Danker T., Enss K., Ossig R., Oberleithner H. Evidence for Ca^{2+} - and ATP-sensitive peripheral channels in nuclear pore complexes // *FASEB J.* – 2001. – **15**, № 11. – P. 1895–1901.
 53. Shumaker D.K., Kuczumski E.R., Goldman R.D. The nucleoskeleton: lamins and actin are major players in essential nuclear functions // *Curr. Opin. Cell Biology.* – 2003. – **15**, № 3. – P. 358–366.
 54. Stehno-Bittel L., Perez-Terzic C., Clapham D.E. Diffusion across the nuclear envelope inhibited by depletion of the nuclear Ca^{2+} store // *Science.* – 1995. – **270**. – P. 1835–1838.
 55. Tonini R., Grohovaz F., Laporta C.A., Mazzanti M. Gating mechanism of the nuclear pore complex channel in isolated neonatal and adult mouse liver nuclei // *FASEB J.* – 1999. – **13**, № 11. – P. 1395–1403.
 56. Tonini R., Ferroni A., Valenzuela S.M., Warton K., Campbell T.J., Breit S.N., Mazzanti M. Functional characterization of the NCC27 nuclear protein in stable transfected CHO-K1 cells // *FASEB J.* – 2000. – **14**, № (9). – P. 1171–1178.
 57. Walther T.C., Pickersgill H.S., Cordes V.C., Goldberg M.W., Allen T.D., Mattaj I.W., Fornerod M. The cytoplasmic filaments of the nuclear pore complex are dispensable for selective nuclear protein import // *J. Cell Biol.* – 2002. – **158**. – P.63–77.
 58. Wei X., Henke V.G., Strubing G., Brown E.B., Clapham D.E. Real-time imaging of nuclear permeation by EGFP in single intact cells // *Biophys. J.* – 2003. – **84**. – P.1317–1327.
 59. Wente S.R. Gatekeepers of the nucleus // *Science.* – 2000. – **288**. – P.1374–1377.
 60. Worman H.J., Courvalin J.C. The inner nuclear membrane // *J. Membr. Biol.* – 2000. – **177**. – P. 1–11.
 61. Worman H.J. Components of the nuclear envelope and their role in human disease // *Novartis Found Symp.* – 2005. – **264**, № 35. – P. 227–230.
 62. Worman H.J., Courvalin J.C. Nuclear envelope, nuclear lamina, and inherited disease // *Int. Rev. Cytol.* – 2005. – **246**. – P. 231–279.
 63. Yamashita M., Sugioka M., Ogawa Y. Voltage- and Ca^{2+} -activated potassium channels in Ca^{2+} store control Ca^{2+} release // *FEBS Journal* – 2006. – **273**. – P.3585–3597.
 64. Yamashita M. ‘Quantal’ Ca^{2+} release reassessed – a clue to oscillation and synchronization // *FEBS Lett.* – 2006. – **580**. – P. 4979–4983.