

О.В. Лунько, О.А. Федоренко, С.М. Марченко

Вплив Ca^{2+} на властивості катіонних каналів великої провідності ядерної оболонки нейронів мозочка

У мембранах ядерної оболонки, які містять інозитол-1,4,5-трифосфатні рецептори (IP_3Rs), були знайдені також численні катіонні канали великої провідності (LCCC). IP_3Rs та LCCC, імовірно, функціонально пов'язані: катіонні канали забезпечують протитечію K^+ , яка запобігає формуванню негативного потенціалу в люмені ядерної оболонки, що в свою чергу може збільшувати тривалість вивільнення Ca^{2+} через IP_3Rs . LCCC раніше не були описані та їх молекулярна природа досі невідома. Ми досліджували вплив Ca^{2+} на властивості цих каналів. Встановлено, що повна відсутність вільних іонів кальцію у люмені ядерної оболонки або їх висока концентрація не змінює основні біофізичні характеристики катіонних каналів великої провідності. Таким чином, ступінь наповнення кальцієвого депо не впливає на активність LCCC.

Ключові слова: ядерна оболонка, іонні канали, кальцієве депо.

ВСТУП

Генетичний апарат еукаріотної клітини оточений ядерною оболонкою, в мембранах якої знаходяться іонні канали з різними біофізичними властивостями [4, 6, 10, 11]. Особливу увагу привертають канали, які відповідають за вивільнення Ca^{2+} з ядерної оболонки всередину ядра. Ми помітили, що в усіх мембранах, де містяться інозитол-1,4,5-трифосфатні рецептори (IP_3Rs), також знаходяться у великій кількості іонні канали з великою провідністю, селективні до моновалентних та непроникні для бівалентних катіонів – так звані катіонні канали великої провідності (LCCC від англ. large conductance cation channels) [1–5].

Властивості іонних каналів внутрішньої ядерної мембрани є мало вивченими, і були нами описані тільки в загальних рисах [1–3, 5]. Наші попередні дослідження показали, що LCCC нечутливі до відомих блокаторів калієвих каналів [2, 3, 9], зокрема до тетраетиламонію (10 ммоль/л) та 4-амінопіридину (2 ммоль/л). La^{3+} (10–100 мкмоль/л), АТФ (0,5–5 ммоль/л), Ca^{2+} (0,05–50 мкмоль/л) та Mg^{2+} (1–5 ммоль/л) також не справляли ніякого ефекту на ці канали. Отже, за своїми власти-

востями LCCC не можуть бути віднесені до жодного відомого типу іонних каналів. Крім того, без селективного блокатора вони не можуть бути виділені та клоновані. Проте, дослідження каналів такого типу викликає великий інтерес, оскільки LCCC можуть впливати на тривалість вивільнення Ca^{2+} з кальцієвого депо, що має велике значення для функціонування клітини [2].

Було зроблено припущення, що іонні канали, які знаходяться на мембранах ядерної оболонки, можуть відноситися до кальцій-залежних калієвих каналів (ВК-каналів від вгл. big potassium channel) [13]. З літератури відомо, що ВК-канали мають високу чутливість до Ca^{2+} [8]. Крім того, при спустошенні кальцієвого депо властивості їх можуть змінюватися. Тому метою нашої роботи було з'ясувати можливий вплив Ca^{2+} на активність LCCC мембран ядерної оболонки нейронів.

МЕТОДИКА

Отримання ізольованих ядер нейронів Пуркінє мозочка

Всі експериментальні процедури проводилися відповідно до біоетичних норм законодавства

України. Для дослідів брали щурів лінії Вістар або Фішер віком 2–3 тиж. Після декапітації тварин виділяли їх мозочок, який клали у посуд з охолодженим (1–4°C) розчином, що містив (ммоль/л): глюконат-К – 150, НЕРЕС-КОН – 5, рН–7,3. Мозочок нарізали на зрізи товщиною до 300 мкм. Після цього зразки тканини гомогенізували пропускаючи через металеву голку діаметром 0,64 мм та інкубували в 1%-му розчині цитрату натрію[7].

Отриманий гомогенат із залишками зруйнованих клітин розміщували в робочій камері інвертованого мікроскопа. Через деякий час неушкоджені ядра осідали та щільно прилягали до дна цієї камери. В результаті описаних дій, ядра нейронів ставали придатними для patch-clamp-реєстрації (методу локальної фіксації потенціалу на ізольованому фрагменті ядерної мембрани нейронів Пуркінє мозочка щура).

Електрофізіологічні дослідження

Запис поодиноких іонних каналів проводили з використанням методу patch-clamp в конфігурації “nucleus-attached” або “excised patches” в режимі фіксації потенціалу. Досліди проходили при 18–20 °С. Patch-піпетки були виготовлені з боросілікатного скла, їх опір варіював від 5 до 12 МОм. Піпетки та робоча камера заповнювалися розчином, що містив (ммоль/л): КСІ – 150, НЕРЕС-КОН – 5; рН – 7,3. Індиферентний електрод Ag–AgCl був сполучений з робочою камерою через агаровий місток.

Значення біофізичних показників трансмембранних струмів отримували за допомогою підсилювача Visual Patch VP-500. Сигнали з підсилювача фільтрували низькочастотним фільтром Бесселя (2 кГц), оцифровували з частотою 10 кГц.

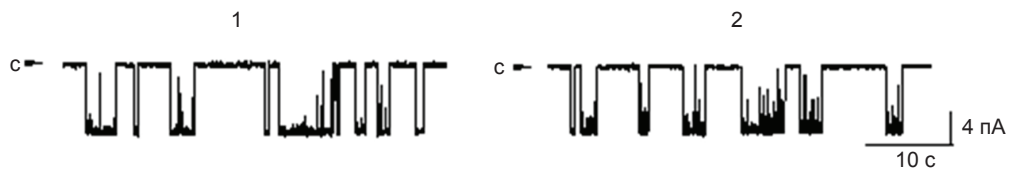


Рис. 1. Експериментальна реєстрація активності катіонного каналу великої провідності, який знаходиться у внутрішній ядерній мембрані нейронів Пуркінє мозочка щура у розчині з 1 ммоль/л вільного Ca^{2+} (1) та в безкальцієвому розчині (2). Запис проводився при потенціалі -40 мВ

Статистичний аналіз

Отримані результати були оброблені та проаналізовані за допомогою програмного забезпечення Clampfit 9.0 (“Axon Instruments”, США). Ймовірність відкритого стану каналу (P_o) вираховували за вищезазначеною програмою автоматично (через функцію “single-channel search – event analysis”), беручи до уваги кількість каналів, що знаходилась на ділянці мембрани в межах діаметру кінчика скляного мікроелектрода. Проміжки часу від початку відкриття до закриття каналу тривалістю менш ніж 0,5 мс не брали до уваги. Для графічного зображення результатів використовували програму OriginPro 8 SR0 (“OriginLab Corporation”, США). Результати на графіках представлені як середнє значення \pm похибка середнього. Достовірність різниці між точками при одному потенціалі на графіку вольт-амперної характеристики оцінювали за допомогою критерію t Стьюдента; статистично вірогідними вважали відмінності при $P < 0,05$, тобто в тих випадках, коли ймовірність різниці становила понад 95 %.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для дослідження активності LCCC за умов відсутності Ca^{2+} додавали до розчину в patch-піпетці та робочій камері 1 ммоль/л EDTA. При високій концентрації Ca^{2+} готували розчин з концентрацією вільного кальцію 1 ммоль/л. В обох розчинах характер роботи каналів був ідентичний: вони мали досить повільну кінетику, тривалість їх відкритого стану сягала декількох секунд (рис. 1).

Виявили, що у безкальцієвому розчині провідність становить 161 ± 7 пСм ($n=7$), а у

розчині з 1 ммоль/л Ca^{2+} – 130 ± 10 пСм ($n=6$; рис. 2). Отже, за умов відсутності вільного Ca^{2+} у розчині провідність LCCC є дещо вищою, проте цю різницю не можна вважати достовірною ($P > 0,01$).

У наших попередніх дослідженнях ми помітили, що активність LCCC має чітко виражену потенціалзалежність: при позитивних значеннях потенціалу ймовірність відкритого стану каналу (P_o) є значно вищою, ніж при негативних [1, 2]. Крім того, при великих позитивних значеннях потенціалу канал був майже весь час відкритий, а при потенціалі нижче за -60 мВ він повністю блокувався, хоча таке блокування було зворотним [2].

Для того щоб дізнатися чи впливає Ca^{2+} на потенціалзалежність LCCC, ми дослідили їхню P_o у безкальцієвому розчині та з концентрацією вільного кальцію 1 ммоль/л. Наші дослідження показали, що наявність іонів кальцію не має значного впливу на характер потенціалзалежності P_o каналів цього типу (рис. 3). В обох розчинах значення P_o достовірно не відрізнялися ($P > 0,01$ для всіх значень потенціалу).

Отже, отримані нами результати вказують на те, що наявність іонів кальцію у розчині не впливає на основні біофізичні властивості

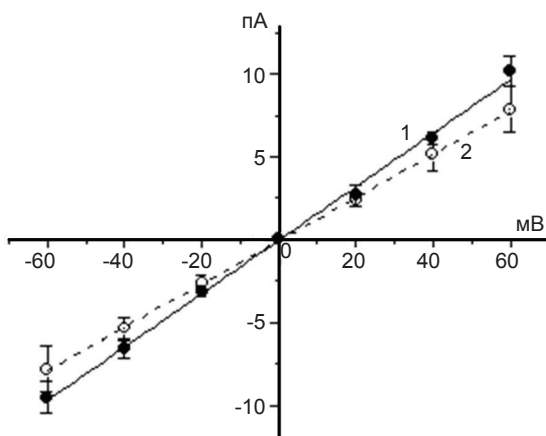


Рис. 2. Вольт-амперна характеристика катіонного каналу великої провідності в розчині з 1 ммоль/л вільного Ca^{2+} (1) та в безкальцієвому розчині (2)

LCCC, які знаходяться у внутрішній мембрані ядерної оболонки. Ми вважаємо, що отриманий нами результат може свідчити про те, що в цих каналах відсутні сайти зв'язування для кальцію, хоча це твердження потребує перевірки із залученням молекулярно-біологічних методів.

Крім того, ми спростовуємо припущення, що іонні канали, які знаходяться у мембранах ядерної оболонки відносяться до ВК-каналів [13], оскільки LCCC не мають високої чутливості до Ca^{2+} . Таким чином, питання про належність цих каналів до якогось відомого типу калієвих каналів залишається на цей час відкритим.

Іонні канали з подібними властивостями були описані в мембранах саркоплазматичного ретикулуму [12], проте віднести їх до будь-якого відомого типу катіонних каналів також виявилось неможливим. Ми припускаємо, що описані нами LCCC в мембранах ядерної оболонки ідентичні іонним каналам сарко-/ендоплазматичного ретикулуму та потрібні для функціонування перинуклеарного простору як кальцієвого депо [2]. Вивільнення Ca^{2+} із депо пов'язано з перенесенням досить великого електричного заряду крізь відповідні мембрани. Якщо перинуклеарний простір виконує функцію кальцієвого депо,

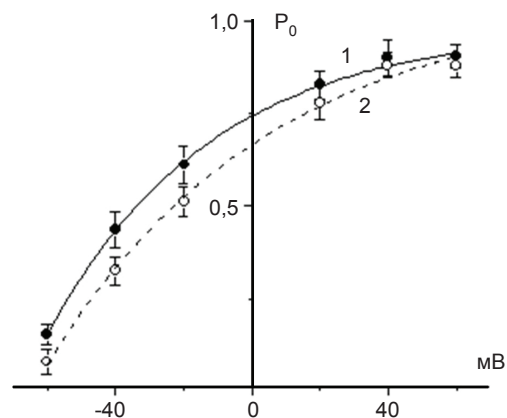


Рис. 3. Залежність ймовірності відкритого стану (P_o) катіонного каналу великої провідності від потенціалу при концентрації Ca^{2+} 1 ммоль/л (1) та в безкальцієвому розчині (2). Експериментальні дані були апроксимовані за рівнянням Больцмана

такий процес буде супроводжуватися появою в ньому негативного потенціалу [2, 3]. Потік одновалентних катіонів, спрямований в протилежний бік відносно струму іонів кальцію при вивільненні останніх з депо, буде перешкоджати різкому зниженню потенціалу в перинуклеарному просторі й таким чином, буде збільшувати тривалість кальцієвого сигналу. Проте при значних негативних потенціалах у люмені ядерної оболонки активність LCCC значно знижується, що призводить до ще більшого зростання негативного потенціалу в перинуклеарному просторі, та в свою чергу інгібує IP₃Rs, і припиняючи вивільнення Ca²⁺ з депо [2].

Отже, концентрація вільного Ca²⁺ у розчині не впливає на роботу катіонних каналів великої провідності, які розташовані у внутрішній мембрані ядерної оболонки нейронів. Можна стверджувати, що активність LCCC не залежить від ступеня насиченості внутрішньоклітинного кальцієвого депо.

Робота була виконана при підтримці Державної ключової лабораторії молекулярної та клітинної біології (grant DFFD F 46.2/001).

О.В. Лунько, О.А. Федоренко, С.М. Марченко

ВОЗДЕЙСТВИЕ CA²⁺ НА СВОЙСТВА КАТИОННЫХ КАНАЛОВ БОЛЬШОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ ЯДЕРНОЙ ОБОЛОНКИ НЕЙРОНОВ МОЗЖЕЧКА

В мембранах ядерной оболочки, содержащей инозитол-1,4,5-трифосфатные рецепторы (IP3Rs), были найдены также многочисленные катионные каналы большой проводимости (LCCC). IP3Rs и LCCC, вероятно, функционально связаны: катионные каналы обеспечивают противоток K⁺, который предотвращает формирование отрицательного потенциала в люменах ядерной оболочки, что в свою очередь может увеличивать продолжительность высвобождения Ca²⁺ через IP3Rs. LCCC ранее не были описаны и их молекулярная природа до сих пор неизвестна. Мы исследовали влияние Ca²⁺ на свойства этих каналов. Установлено, что полное отсутствие свободных ионов кальция в люменах ядерной оболочки или их высокая концентрация не изменяет основные биофизические характеристики катионных каналов большой проводимости. Таким образом, степень наполнения кальциевого депо не влияет на активность LCCC.

Ключевые слова: ядерная оболочка, ионные каналы, кальциевое депо

O.V. Lun'ko, O.A. Fedorenko S.M. Marchenko

THE EFFECT OF CA²⁺ ON THE PROPERTIES OF THE LARGE CONDUCTANCE CATION CHANNELS OF THE NUCLEAR ENVELOPE OF THE CEREBELLAR NEURONS

Previously we have found the large conductance cation channels (LCCC) in the nuclear membranes, where inositol-1,4,5-triphosphate receptors (IP₃Rs) were also observed. Probably IP₃Rs and LCCC are functionally connected: LCCC may provide the counterflow of K⁺, which prevent the formation of the negative potential in the lumen of the nuclear envelope and in such way may prolong the Ca²⁺ releasing by IP₃Rs. LCCC are poorly studied and their molecular nature is still unknown. We investigated the effect of Ca²⁺ on properties of these channels. Our results demonstrated the main biophysical properties of LCCC changed significantly neither in Ca²⁺-free solution, nor with high concentrations of Ca²⁺ in the nuclear lumen. So, the level of Ca²⁺ repletion of the store does not influence the activity of LCCC.

Key words: nuclear envelope, ion channels, calcium store.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Fedorenko O.A., Duzhyy 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.
2. Fedorenko O.A., Marchenko S.M. The meaning of cation channels in the function of NE as Ca²⁺ store // *Neurophysiology*. – 2010. – **42**, № 4. – P. 281–286.
3. Fedorenko O.A., Yarotsky V., Duzhyy D.E., Marchenko S.M. The large conductance ion channels in the nuclear envelope of central neurons // *Pflug. Arch.* – 2010. – **460**. – P. 1045–1050.
4. Fedorenko O.A., Marchenko S.M. Spontaneously Active Ion Channels of the Nuclear Envelope Membrane // *Int. J. of Physiol. & Pathophysiol.* – 2011. – **2**, № 2. – P. 183–195.
5. Fedorenko O.A., Marchenko S.M. Properties of Large-Conductance Cationic Channels in the Neuronal Nuclear Envelope // *Neurophysiology*. – 2011. – **43**, № 3. – P. 192–194.
6. 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.
7. Humbert J.P., Matter N., Artault J.C., Koppler P., Malviay A.N. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is located to the inner nuclear membrane vindicating regulation of nuclear calcium signaling by inositol 1,4,5-trisphosphate // *J. Biol. Chem.* – 1996. – **271**, № 1. – P. 478–485.
8. Latorre R., Brauchi S. Large conductance Ca²⁺-activated K⁺ (BK) channel: activation by Ca²⁺ and voltage // *Biol.*

- Res. – 2006. – **39**, № 3. – P. 385–401.
9. Marchenko S.M., Yarotsky V.V., Kovalenko T.N., Kostyuk P.G., Thomas R.C. Spontaneously active and InsP_3 -activated ion channels in cell nuclei from rat cerebellar Purkinje and granule neurons // J. Physiol. – 2005. – **565** № 15. – P. 897–910.
 10. Mazzanti M, DeFelice L.J., Cohn J., Malter H. Ion channels in the nuclear envelope // Nature. – 1990. – **22**, № 343(6260). – P. 764–767.
 11. Mazzanti M., Bustamante J.O., Oberleithner H. Electrical dimension of the nuclear envelope // Physiol. Rev. – 2001. – **81**, №1. – P. 1–19.
 12. Picard L., Cote K., Teijeira J., Greentree D, Rousseau E. 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.
 13. Yamashita M., Sugioka M., Ogawa Y. Voltage- and Ca^{2+} -activated potassium channels in Ca^{2+} store control Ca^{2+} release // FEBS J. – 2006. – **273**. – P. 3585–3597.

Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ
E-mail: olena.fedorenko@biph.kiev.ua

Матеріал надійшов до редакції 10.09.2012