

Іонні струми поодиноких каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів щура

О.А. Котик, А.Б. Котлярова, А.О. Поліщук, С.М. Марченко

Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: smm1003@gmail.com

З використанням методу patch-clamp у конфігурації nucleus attached встановлено, що ядерна мембрана кардіоміоцитів щура містить різні типи іонних каналів з провідністю у діапазоні від 10 до 400 пСм. Зокрема, зареєстровано інозитол-1,4,5-трифосфатні рецептори з провідністю 384 ± 5 пСм, а також катіонні канали – 209 ± 13 пСм, подібні за властивостями до LCC-каналів, описаних раніше у нейронах. Крім того, нами зареєстровано принаймні два типи іонних каналів, провідність яких є значно більшою, ніж у LCC-каналів і декілька типів іонних каналів з нижчою провідністю (10-90 пСм). Ключові слова: іонні канали; ядерна мембрана; кардіоміоцити; Ca^{2+} -сигналізація; інозитол-1,4,5-трифосфатні рецептори.

ВСТУП

Ядерна оболонка є напівпроникним бар'єром між цитоплазмою та нуклеоплазмою. Транспорт крізь ядерну мембрану забезпечується наявністю у ній численних ядерних пор та іонних каналів з різними біофізичними властивостями. Незважаючи на велику різноманітність іонних каналів у ядерній мембрані [1-7] та численні дослідження, присвячені внутрішньоклітинним сигнальним механізмам, зокрема Ca^{2+} -сигналізації, фізіологічна роль катіон-селективних іонних каналів у ядерній мембрані залишається остаточно нез'ясованою. Ключова роль іонів кальцію у скороченні кардіоміоцитів є загально визнаною. Значно менш дослідженим залишається питання механізмів участі Ca^{2+} у регуляції транскрипції генів, адже відомо, що кальцієві сигнали поширюються не лише в цитозолі, але й у ядрі [8-10]. Іони кальцію можуть пасивно дифундувати із цитоплазми у ядро через ядерні пори [11]. Крім пор у ядерній мембрані наявні специфічні системи транспортування Ca^{2+} – інозитол-1,4,5-трифосфатні [1, 12] і ріанодинові рецептори [13, 14]. Таким чином іонні канали ядерної мембрани

є невід'ємною частиною системи Ca^{2+} -сигналізації, а відтак відіграють важливу роль у функціонуванні серцевого м'яза і можуть стати мішенню нових типів медичних препаратів для лікування захворювань серця. Також слід зазначити важливість досліджень іонних каналів ядерної мембрани на різних об'єктах, адже відомо, що їх експресія та, відповідно, характер поширення Ca^{2+} -сигналів можуть відрізнятися залежно від типу клітин. Раніше ми запропонували спосіб ізолювання ядер, придатних для дослідження методом patch-clamp та описали високопровідні катіонні канали (LCC-channels), інозитол-1,4,5-трифосфатні рецептори та інші іонні канали ядерної мембрани нейронів центральної нервової системи [1].

Метою цієї роботи було ідентифікувати іонні канали ядерної мембрани кардіоміоцитів.

МЕТОДИКА

Дослідження виконано на щурах лінії Вістар віком 2–3 тиж. Після анестезії і декапітації швидко ізолювали міокард, поміщали його в попередньо окисгенований розчин Креб-

© О.А. Котик, А.Б. Котлярова, А.О. Поліщук, С.М. Марченко

са-Хенке (NaCl–118,1; NaHCO₃–25; KCl–4,7; NaH₂PO₄–1,36; MgCl₂–1,2; CaCl₂–1; глюкоза–11,1 ммоль/л, рН 7,4), відмивали від крові та подрібнювали. Для ізолювання ядер кардіоміоцитів тканину переносили у розчин для гомогенізації такого складу (ммоль/л): цукроза–300; KCl–60; HEPES–10; ЕДТА–1 (рН 7,2), який містив інгібітори протеаз Sigmafast Protease Inhibitor Tablets («Sigma», США) або Complete protease Inhibitor cocktail tablets («Roche», Німеччина) у концентраціях, зазначених виробниками, дитіотриетол (1 ммоль/л) та гомогенізували на холоді протягом 30–40 с у скляному гомогенізаторі з тефлоновим поршнем.

Отриманий гомогенат центрифугували при 1000 g упродовж 10 хв. Супернатант зливали, а осад ресуспендували в 1 мл розчину такого самого складу, як і для заповнення піпеток та камери (ммоль/л): KCl–150; HEPES–8; HEPES-калієва сіль–12; ЕДТА–1 (рН 7,2).

У серіях експериментів для визначення селективності іонного каналу розчин у піпетці замінювали на (ммоль/л): калію глюконат–150; HEPES–8; HEPES-калієва сіль–12; ЕДТА–1 (рН 7,2) – при визначенні селективності для Cl⁻; або на (ммоль/л): CaCl₂–100; HEPES–20 (рН 7,2) – при визначенні селективності для Ca²⁺. Для реєстрації інозитол-1,4,5-трифосфатних рецепторів до розчину додавали CaCl₂–0,384 ммоль/л ($[Ca^{2+}]_{(вільний)} \approx 100$ мкмоль/л), АТФ (0,5 ммоль/л) та інозитол-1,4,5-трифосфат у концентрації 3 мкмоль/л. Концентрацію вільного Ca²⁺ розраховували за допомогою програми Maxchelator. Усі використані в розчинах реагенти фірми «Sigma» (США).

Реєстрацію іонних струмів здійснювали методом patch-clamp у конфігурації nucleus attached за допомогою установки, зібраної на базі інвертованого мікроскопа LEICA DM IRB, підсилювача Visual-Patch 500 та комп'ютера. Patch-піпетки виготовляли з боросилікатних заготовок («Sutter Instrument», США). Опрацювання результатів здійсню-

вали з використанням програм Clampfit та Origin. Результати представлено у вигляді $M \pm m$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Застосовуючи метод patch-clamp, нами підтверджено наявність у ядерній мембрані кардіоміоцитів щура інозитол-1,4,5-трифосфатних рецепторів з середньою провідністю 384 ± 5 пСм ($n = 4$; рис. 1 а, б), експресію яких раніше встановлено з використанням специфічних антитіл [15]. Слід зазначити також, що в ізолюваних міоцитах шлуночків серця наявні інозитол-1,4,5-трифосфатні рецептори виключно другого типу [16], в той час як у нейронах, зокрема клітинах Пуркінє мозочка, переважає перший тип [1].

Інозитол-1,4,5-трифосфатні рецептори є Ca²⁺-селективними каналами, проникними також для K⁺ і Ba²⁺ [17, 18]. Ми припускаємо, що не лише кальцієві канали можуть брати участь у поширенні кальцієвого сигналу. При вивільненні Ca²⁺ з внутрішньоклітинних депо позитивно заряджені частинки з люмену переміщуються у цитоплазму. За відсутності протилежно спрямованого потоку позитивно заряджених іонів, мембранний потенціал швидко зміститься до значення кальцієвого рівноважного потенціалу і вивільнення Ca²⁺ з депо припиниться. LCC-канали, описані нами раніше у ядрах нейронів центральної нервової системи, роблять мембрану депо легко проникною для іонів калію [1]. Можна припустити, що зміна потенціалу люмену, що виникає при вивільненні Ca²⁺, компенсується протилежно спрямованим потоком K⁺ через LCC-канали, полегшуючи цим самим подальше вивільнення Ca²⁺ з депо. Оскільки за властивостями ядерна та ендоплазматична мембрани є подібними [19], LCC-канали можуть бути наявні й у мембранах ендоплазматичного ретикулула.

Серед іонних каналів, зареєстрованих у ядерній мембрані кардіоміоцитів, найчастіше спостерігали активність каналу з середньою

провідністю 209 ± 13 пСм ($n = 44$). За провідністю та кінетичними характеристиками ці канали подібні до описаних нами раніше LCC-каналів ядерної мембрани нейронів Пуркінє, середня провідність яких становила 198 ± 27 пСм [1]. Вони характеризуються повільною динамікою (рис. 2, а) і їх активність суттєво залежить від потенціалу. На позитивних значеннях потенціалу ці канали практично весь час були відкритими, а на негативних – їх активність знижувалася. Вольт-амперна характеристика LCC-подібного каналу представлена на рис. 2, б.

Для визначення селективності зареєстрованого каналу ми замінили стандартний розчин KCl в піпетці на еквімолярний розчин K-глюконату (ммоль/л): калію глюконат–150;

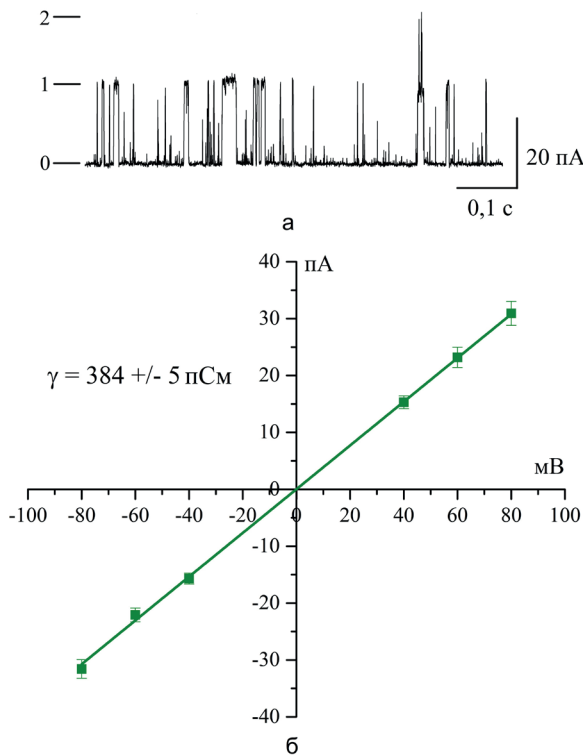


Рис. 1. Типова реєстрація активності інозитол-1,4,5-трифосфатного рецептора ядерної мембрани кардіоміоцитів при потенціалі +80 мВ (а) та його усереднена вольт-амперна характеристика (б): реєстрація у симетричному середовищі (ммоль/л): KCl–150; HEPES–8; HEPES-калієва сіль–12; EGTA–1; CaCl₂–0,384 ([Ca²⁺]_{вільний} ≈ 100 мкмоль/л); АТФ–0,5; інозитол-1,4,5-трифосфат–0,003; рН 7,2

HEPES–8; HEPES-калієва сіль–12; EGTA–1. За цих умов спостерігали струми вхідного й вихідного напрямку, що свідчить про непроникність цього каналу для Cl⁻ ($n = 10$). За наявності у піпетці розчину (ммоль/л): CaCl₂–100; HEPES–20 канали вдалося зареєструвати лише за негативних значень потенціалу, що є підтвердженням їх непроникності для Ca²⁺ ($n = 4$). Крім того, CaCl₂ (100 ммоль/л) призводить до зменшення калієвого струму через ці канали, оскільки амплітуда їх відкривання за таких умов була меншою, ніж за наявності у піпетці KCl чи K-глюконату (результати не представлено). Подібні дані раніше були отримані для LCC-каналів ядерної мембрани нейронів центральної нервової системи [1, 3]. Таким чином, цілком вірогідно, що канали з провідністю 209 ± 13 пСм є LCC-каналами.

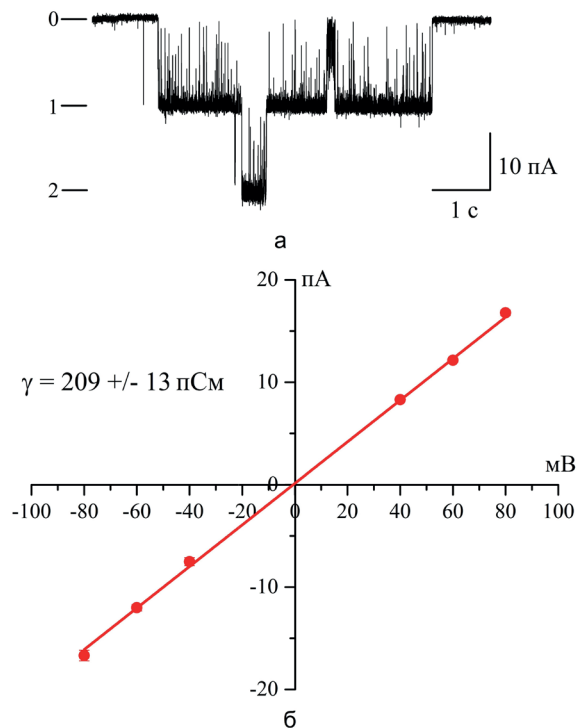


Рис. 2. Іонний струм через LCC-подібний катіонний канал ядерної мембрани кардіоміоцитів з провідністю 209 ± 13 пСм при потенціалі –80 мВ (а) та його вольт-амперна характеристика (б): реєстрація у симетричному середовищі (ммоль/л): KCl–150; HEPES–8; HEPES-калієва сіль–12; EGTA–1; рН 7,2

У ядерній мембрані кардіоміоцитів нами зареєстровано також канал з середньою провідністю 312 ± 8 пСм ($n = 5$). Типова реєстрація його активності та вольт-амперна характеристика представлені на рис. 3 а і б відповідно. Цей канал за кінетикою нагадує типові LCC-канали, але має більшу амплітуду і спостерігається значно рідше (в 5 петчах з 54). Крім нього вдалося зареєструвати іонний канал з провідністю 340 пСм ($n = 1$), який відрізняється від попереднього повільнішою кінетикою (рис. 4 а, б).

Yazawa і співавт. у 2007 р. клонували іонні канали двох типів TRIC-A і TRIC-B, які є селективними до моновалентних катіонів і складаються з трьох гомотримерів [20]. Згодом Zhou і співавт. висунули гіпотезу участі TRIC-каналів у внутрішньоклітинній кальцієвій сигналізації [21], подібну за змістом до запропонованої нами раніше для участі LCC-каналів у нейтралізації зміни заряду в люмені кальцієвого депо при вивільненні Ca^{2+} з нього [1].

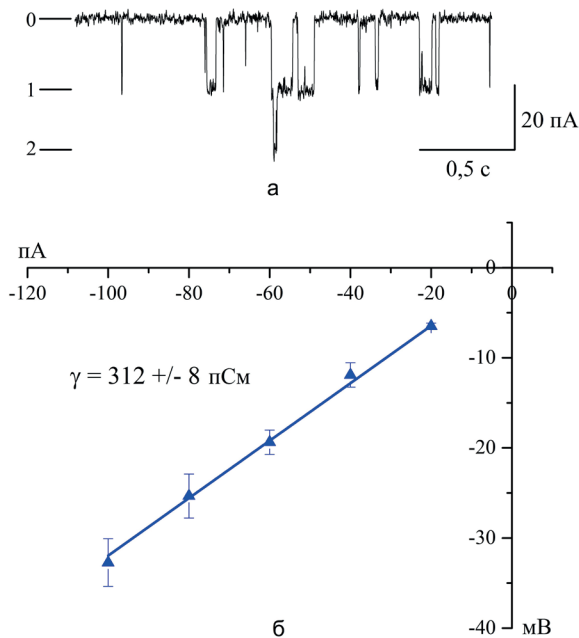


Рис. 3. Активність іонного каналу з провідністю 312 ± 8 пСм при потенціалі -80 мВ (а) та його усереднена вольт-амперна характеристика (б): реєстрація у симетричному середовищі (ммоль/л): KCl-150; NEPES-8; NEPES-калієва сіль-12; EGTA-1; pH 7,2

Згідно з цим припущенням канали TRIC-A безпосередньо модулюють вивільнення Ca^{2+} через ріанодинові рецептори, в той час, як TRIC-B регулюють функціонування інозитол-1,4,5-трифосфатних рецепторів [21]. TRIC-A експресуються переважно у збудливих тканинах, зокрема нервовій і м'язовій, а TRIC-B ідентифіковані у більшості тканин ссавців. Обидва підтипи цих каналів наявні у мембранах ендоплазматичного ретикулула, але відсутні у плазматичній мембрані [20]. При цьому провідність каналу TRIC-B у середовищі, що містило 210 ммоль/л K^+ , становить 199 пСм [22]. Можна висунути припущення, що зареєстрований нами катіонний канал з провідністю 209 ± 13 пСм є еквівалентний TRIC-каналу типу В, а канал з провідністю 312 ± 8 пСм відповідає типу А. Крім вищеописаних каналів, у ядерній мембрані кардіоміоцитів нами зареєстровано

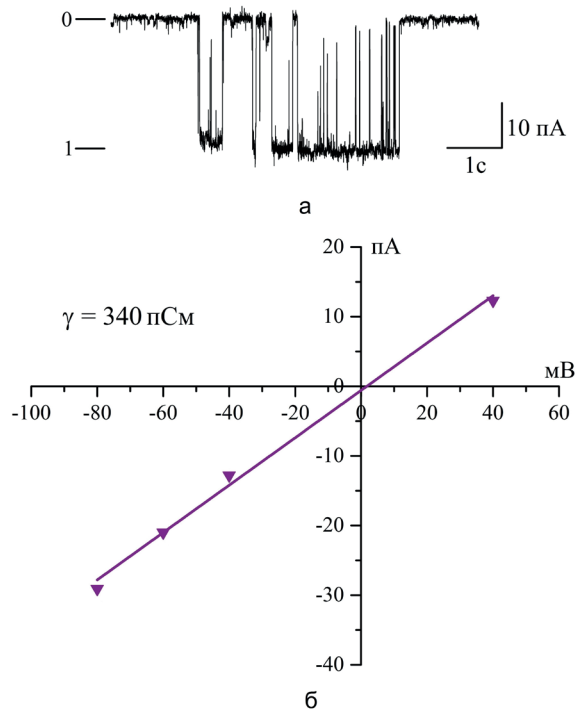


Рис. 4. Реєстрація струму через іонний канал з провідністю 340 пСм при потенціалі -80 мВ (а) та його вольт-амперна характеристика (б): реєстрація у симетричному середовищі (ммоль/л): KCl-150; NEPES-8; NEPES-калієва сіль-12; EGTA-1; pH 7,2

($n = 12$) іонні канали з відносно невеликою провідністю (10–90 пСм).

Отже, нашими дослідженнями підтверджено наявність у ядерній мембрані кардіоміоцитів інозитол-1,4,5-трифосфатних рецепторів з провідністю 384 ± 5 пСм. До того ж, ідентифіковано катіонні канали з провідністю 209 ± 13 пСм, подібні до LCC-каналів [1], раніше описаних у нейронах. У ядерній мембрані кардіоміоцитів нами зареєстровано також канали з провідністю 312 ± 8 пСм, 340 пСм та декілька типів іонних каналів з відносно невеликою провідністю (10–90 пСм), дослідження біофізичних властивостей і функцій яких стане наступним етапом нашої роботи.

О.А. Котык, А.Б. Котлярова, А.О. Полищук, С.М. Марченко

SINGLE-CHANNEL ION CURRENTS IN THE NUCLEAR ENVELOPE OF RAT CARDIOMYOCYTES

Using the patch clamp technique in nucleus attached configuration we have found that the nuclear membrane of rat cardiomyocytes contains different types of ion channels with conductances in the range from 10 to 400 pS. In particular, we recorded inositol 1,4,5-trisphosphate receptors with conductance of 384 ± 5 pS and 209 ± 13 pS cation channels similar to LCC-channels, previously reported in neurons. In addition, we found at least two types of ion channels with significantly higher conductance than that of LCC-channels and several types of ion channels with lower conductance (10-90 pS).

Key words: ion channels; nuclear envelope; cardiomyocytes; Ca^{2+} -signalling; inositol 1,4,5-trisphosphate receptors.

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

Е.А. Котык, А.Б. Котлярова, А.А. Полищук, С.М. Марченко

ИОННЫЙ ТОК ОДИНОЧНЫХ КАНАЛОВ ЯДЕРНОЙ МЕМБРАНЫ КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫСЫ

С использованием метода patch-clamp в конфигурации nucleus attached установлено, что ядерная мембрана кардиомиоцитов крысы содержит различные типы ионных каналов с проводимостью в диапазоне от 10 до 400 пСм. В частности, нами зарегистрировано инозитол-1,4,5-трифосфатные рецепторы с проводимостью 384 ± 5 пСм,

а так же катионные каналы – 209 ± 13 пСм, сходные с LCC-каналами, описанными ранее в нейронах. Кроме того, мы зарегистрировали по крайней мере два типа ионных каналов, проводимость которых существенно больше, чем у LCC-каналов и несколько типов ионных каналов с низкой проводимостью (10-90 пСм).

Ключевые слова: ионные каналы; ядерная оболочка; кардиомиоциты; Ca^{2+} -сигнализация; инозитол-1,4,5-трифосфатные рецепторы.

REFERENCES

1. Marchenko SM, Yarotsky VV, Kovalenko TN, Kostyuk PG, Thomas RC. Spontaneously active and $InsP_3$ -activated ion channels in cell nuclei from rat cerebellar Purkinje and granule neurons. *J Physiol*. 2005;565(3):897–910.
2. Fedorenko EA, Duzhii DE, Marchenko SM. Spontaneously active ion channels of membranes of the nuclear envelope of hippocampal pyramidal neurons. *Neurofiziologiya/Neurophysiology*. 2007;39(1):3–8.
3. Fedorenko O, Yarotsky V, Duzhyy D, Marchenko S. The large-conductance ion channels in the nuclear envelope of central neurons. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*. 2010;460(6):1045–50.
4. Fedorenko OA, Duzhyy DE, Marchenko SM. Nuclear ion channels of the granule cells from the dentate gyrus. *Fiziol Zh*. 2007;53(3):18–25 [Ukrainian].
5. Fedorenko OA, Marchenko SM. Ion channels of the nuclear membrane of hippocampal neurons. *Hippocampus*. 2014;24(7):869–76.
6. Fedorenko OA, Marchenko SM. Properties of inositol-1,4,5-trisphosphate receptors in the nuclei of neurons of the rat CNS. *Neurophysiology*. 2014;46(3):293–6.
7. Mazzanti M., Defelice L, Cohen J, Malter H. Ion channels in the nuclear envelope. *Nature*. 1990;22(343):764–7.
8. Gerasimenko OV, Gerasimenko JV, Tepikin AV, Petersen OH. ATP dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca^{2+} from the nuclear envelope. *Cell*. 1995;80(3):439–44.
9. Ibarra C, Vicencio JM, Varas-Godoy M, Jaimovich ED, Beverly A, Rothermele F, et al. An integrated mechanism of cardiomyocyte nuclear Ca^{2+} signaling. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;75:40–8.
10. Oliveira AG, Guimarães ES, Andrade LM, Menezes GB, Fatima LM. Decoding Calcium signaling across the nucleus. *Physiology (Bethesda)*. 2014; 29(5):361–8.
11. Ljubojevic S, Walther S, Asgarzoei M, Sedej S, Pieske B, Kocksammer J. In situ calibration of nucleoplasmic versus cytoplasmic $Ca^{(2)+}$ concentration in adult cardiomyocytes. *Biophys J*. 2011;100(10):2356–66.
12. Bare DJ, Kettlun CS, Liang M, Bers DM, Mignery GA. Cardiac type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: interaction and modulation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biol Chem*. 2005;280(16):15912–20.
13. Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P, Meldolesi J. Molecular

- and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev.* 1994;74(3):595–637.
14. Zheng J, Chen Z, Yin W, Miao L, Zhou Z, Ji G. Ryanodine receptors are involved in nuclear calcium oscillation in primary pancreatic β -cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;423(2):207–11.
 15. Wu X, Zhang T, Bossuyt J, Li X, McKinsey TA, Dedman JR, et al. Local InsP_3 -dependent perinuclear Ca^{2+} signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. *J Clin Invest.* 2006;116(3):675–82.
 16. Perez PJ, Ramos-Franco J, Fill M, Mignery GA. Identification and functional reconstitution of the type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor from ventricular cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 1997;272(38):23961–9.
 17. Bezprozvanny I, Ehrlich BE. Inositol 1,4,5-trisphosphate InsP_3 -gated Ca^{2+} channels from cerebellum, conduction properties for divalent cations and regulation by intraluminal calcium. *J General Physiol.* 1994;104(5): 821–56.
 18. Boehning D, Mak DO, Foskett JK, Joseph SK. Molecular determinants of ion permeation and selectivity in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor Ca^{2+} channels. *J Biol Chem.* 2001;276(17):13509–12.
 19. Berridge MJ. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signal organelle. *Cell Calcium.* 2002;32(5–6):235–49.
 20. Yazawa M, Ferrante C, Feng J, Mio K, Ogura T, Zhang M, et al. TRIC channels are essential for Ca^{2+} handling in intracellular stores. *Nature.* 2007;448:78–82.
 21. Zhou X, Lin P, Yamazaki D, Park KH, Komazaki S, Chen SRW, et al. Trimeric intracellular cation channels and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Calcium homeostasis. *Circ Res.* 2014;114(4):706–16.
 22. Venturi E, Matyjaszkiewicz A, Pitt SJ, Tsaneva-Atanasova K., Nishi M, Yamazaki D, et al. TRIC-B channels display labile gating: evidence from the TRIC-A knockout mouse model. *Pflugers Arch – Eur J Physiol.* 2013; 465(8):1135–48.

*Матеріал надійшов
до редакції 15.06.2016*