

ПРОВІДНІСТЬ КАНАЛІВ ІНОЗИТОЛ-1,4,5-ТРИФОСФАТНИХ РЕЦЕПТОРІВ ЯДЕРНОЇ ОБОЛОНКИ НЕЙРОНІВ ПУРКІН'Є

Надійшла 05.09.14

Інозитол-1,4,5-трифосфатні рецептори (IP_3R) відіграють ключову роль у забезпеченні внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації. До останнього часу питання, чи є характерним для каналу поодинокого IP_3R лише один рівень провідності чи такий канал може мати декілька рівнів провідності, залишалося відкритим. В експериментах на ізольованих ядрах нейронів Пуркін'є мозочка шурів ми досліджували, як змінюється провідність каналів цих рецепторів внутрішньої мембрани ядерної оболонки при різних значеннях потенціалу. В усіх випадках такі канали демонстрували лише один рівень унітарної провідності; жодних підрівнів у діапазоні потенціалів від 100 мВ до +100 мВ не спостерігалось. Пригнічення активності IP_3R при негативних потенціалах було зумовлене зменшенням вірогідності відкритого стану каналу. Отже, припущення про багаторівневність провідності поодиноких каналів IP_3R у вивченому об'єкті не підтверджується; вивільнення Ca^{2+} через канали цих рецепторів має квантовий характер.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ядерна оболонка, інозитолтрифосфатні рецептори, провідність поодинокого каналу.

ВСТУП

Кальцій – один із найголовніших вторинних посередників у процесах внутрішньоклітинної сигналізації, яка забезпечує контроль великої кількості клітинних процесів [1–3]. Ключовими елементами, відповідальними за регуляцію концентрації Ca^{2+} у клітині, є кальційзвільнюючі канали інозитол-1,4,5-трифосфатних та ріанодинових рецепторів (IP_3R і RyR відповідно), через які відбувається вивільнення Ca^{2+} із внутрішньоклітинних кальцієвих депо, зокрема ендоплазматичного ретикулу (ER) [4, 5]. Регуляція функціонування цих рецептор-канальних комплексів є досить складною [6–8]. Проникність IP_3 -активованих кальцієвих каналів може істотно модулюватися в результаті фосфорилування, дефосфорилування [9] або змін концентрації АТФ [10, 11]. Крім того, на діяльність IP_3R впливає зв'язування з низкою білків, таких як RACK1 [12], білок 4.1N [13], IRBIT [14], Vcl-2 [15] тощо. Було також показано, що активність IP_3Rs може змінюватися залежно від потенціалу на мембрані [16–18].

Як виявилось, активність IP_3R демонструє дзвоноподібну залежність від рівня Ca^{2+} , тобто може ефективно блокуватися при певних високих концентраціях цього іона [19]. Вважалося вірогідними й інші механізми інактивації даних рецепторів. Зокрема, як вважав Фоскет [16], зміни негативного потенціалу на мембранах, на яких присутні IP_3R , можуть призводити до зменшення рівня провідності каналів таких рецепторів [16, 20]. При цьому питання, чи є характерними для даних каналів єдине значення унітарної провідності або декілька таких значень, залишалося відкритим.

У наших попередніх роботах ми показали наявність великої кількості IP_3R на внутрішній мембрані ядерної оболонки нейронів Пуркін'є мозочка [21, 22]. У даній роботі ми досліджували залежність провідності IP_3 -активованих кальцієвих каналів цих рецепторів від потенціалу, вважаючи, що результати подібних експериментів допоможуть вирішити згадане вище питання.

МЕТОДИКА

Доступ до внутрішньої мембрани ізольованих ядер нейронів Пуркін'є мозочка шурів. Ізольовані ядра нейронів Пуркін'є отримували з використанням методи-

¹ Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).

² Державна ключова лабораторія молекулярної та клітинної біології, Київ (Україна).

³ Університет Ланкастера, Велика Британія.

Ел. пошта: olena.fedorenko@biph.kiev.ua (О. А. Федоренко).

ки, описаної в наших попередніх роботах [18, 21]. Після евтаназії самців щурів лінії Вістар (вік два-три тижні) їх головний мозок швидко видалали; мозочок нарізали на зрізи завтовшки не більше 400 мкм. Отримані зрізи занурювали в базовий розчин, що вміщував (у мілімолях на 1 л) глюконат калію – 150, NERES – 2.5, NERES-K – 2.5 (pH 7.3). До розчину додавали „коктейль” протеїнових інгібіторів („Roche Diagnostics”, Велика Британія) у концентраціях, зазначених виробником. Ізольовані ядра нейронів Пуркін’є отримували після гомогенізації тканини (пропускання інкубованих у такому розчині зрізів через ін’єкційну голку діаметром 0.64 мм) та наступної обробки гомогенату протягом 20–30 хв 1 %-вим розчином цитрату натрію з повільним перемішуванням. Після такої обробки ядра втрачали свою зовнішню мембрану [23], а їх внутрішня мембрана ставала досяжною для підведення петч-піпетки. Отриманий гомогенат розміщували в робочій камері під інвертованим мікроскопом. Після відмивання залишків ушкоджених органел базовим розчином ядра нейронів ставали придатними для петч-клемп-відведень.

Реєстрація активності IP_3R . Дослідження струмів через поодинокі кальцієві канали IP_3R проводили з використанням методу петч-клемп у конфігурації “nucleus-attached” або “excised patches” у режимі фіксації потенціалу. Експерименти виконували при температурі 18–20 °С. Петч-піпетки виготовляли з боросилікатного скла (“Sutter Instruments”, США); їх опір варіював від 5 до 12 МОм. Піпетки заповнювали базовим розчином. Референтний електрод (Ag-AgCl) був сполучений з робочою камерою через агаровий місток; камеру заповнювали базовим розчином.

Сигнали з виходу підсилювача Visual Patch VP-500 (“Bio-Logic”, Франція) пропускали через низькочастотний фільтр Бесселя (частота зрізу 2 кГц), оцифровували з частотою 10^4 с⁻¹ і зберігали на жорсткому диску комп’ютера. Аналіз отриманих результатів проводили з використанням програми “pClamp 9.0” (“Axon Instruments”, США). На рисунках у всіх випадках вказано електричний потенціал вмісту петч-піпетки; значення потенціалу розчину в робочій камері вважали рівним 0 мВ.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Додавання агоністів IP_3Rs (IP_3 , Ca^{2+} або АТР) до розчину, що контактував із нуклеоплазматичним боком внутрішньої мембрани ядер, ізольованих із

нейронів Пуркін’є (у наших дослідах – до розчину в робочій камері) призводило до активації відповідних іонних каналів більш ніж у 88 % випадків відведень від поодиноких IP_3R . Середнє значення провідності через канал такого рецептора було досить високим (356 ± 4 пСм, $n = 7$). Провідність каналів IP_3R демонструвала чітку потенціалзалежність. Вірогідність відкритого стану (P_o) цих каналів була значно вищою при позитивних значеннях потенціалу, а при негативних значеннях їх активність істотно пригнічувалася (рис. 1, А). Очевидно, що електричний потенціал вмісту петч-піпетки в наших дослідах відповідає потенціалу, існуючому в люмені ядерної оболонки, тобто активність IP_3R внутрішньої мембрани ядерної оболонки досліджених нейронів пригнічується в умовах негативних потенціалів у люмені згаданої оболонки. Як вважають, негативізація цього потенціалу відбувається внаслідок перенесення великого позитивного заряду під час вивільнення Ca^{2+} з депо.

Інгібування активності IP_3R було показано раніше на ооцитах *Xenopus* [16]. Фоскетт та співробітники після петч-клемп-дослідження струмів через канали цих рецепторів повідомляли про існування декількох (вірогідно, п’яти) рівнів провідності че-

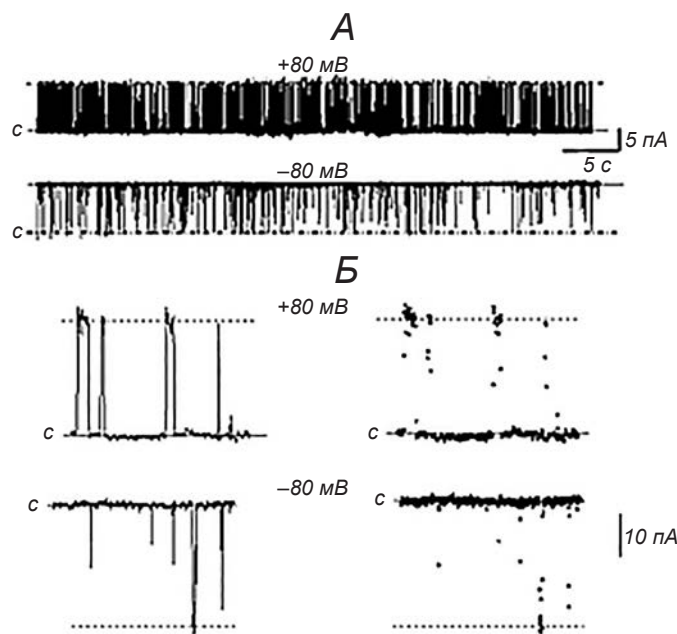


Рис. 1. Оригінальний запис активності каналу інозитол-1,4,5-трифосфатного рецептора при потенціалах +80 та –80 мВ. Незважаючи на те, що активність каналу в умовах тривалої реєстрації при –80 мВ пригнічується, можна спостерігати лише один рівень провідності (А); короткотривалі «каналні піки» не можна вважати тим, що відповідають повному відкриттю каналу (Б).

рез такі канали [16, 20]. Вони вважали, що потенціалзалежне інгібування IP_3R пов'язане з переходом каналів цих рецепторів у стани з меншими рівнями унітарної провідності [16].

У наших же дослідах ми не помітили жодних змін провідності каналів поодиноких IP_3R , навіть при досить великих значеннях потенціалу на мембрані – як у позитивному, так і в негативному діапазонах (рис. 1, А). На записах, котрі тривали декілька хвилин, було помітним зниження активності IP_3R у разі великих негативних потенціалів, але рівні провідності через поодинокий канал не ставали меншими. Зниження активності IP_3R було спричинене зменшенням вірогідності відкритого стану їх каналів (P_o). У свою чергу, зміни значення P_o були зумовлені змінами тривалості відкритого стану каналу (t_o). Даний параметр значно зменшувався при негативних потенціалах, причому тривалість закритого стану каналу (t_c) відповідно ставала більшою. Таким чином, відбувалися зміни частоти спрацьовувань каналу, а не значення провідності через нього.

При детальнішому аналізі епізодів поодиноких спрацьовувань каналу в різних режимах також не було помічено жодних підрівнів його провідності (рис. 1, Б), а короткотривалі «канальні піки» не можна вважати феноменами, що відповідають повноцінним відкриванням каналу.

Аналіз амплітуд струмів через канал в умовах різних потенціалів показав наявність виключно одного значення цього параметра (рис. 2), що також

підтверджує наявність лише одного рівня провідності каналів IP_3R . Крім того, вольт-амперна характеристика даних каналів у симетричному розчині КСІ у діапазоні від -100 до $+100$ мВ була практично лінійною [21].

Зміни активності IP_3R залежали не лише від значення тест-потенціалу, але й від часу його дії. Вірогідність відкритого стану каналу P_o змінювалася швидко при перемиканні з позитивного потенціалу на негативний, та навпаки. Довготривала експозиція IP_3R до потенціалів ≤ -60 мВ поступово призводила до повного блокування їх каналів, проте такий ефект був оборотним. Цікаво, що навіть у разі блокування канали не демонстрували нижчих значень унітарної провідності.

Таким чином, наші результати вказують на те, що при дії негативних потенціалів активність IP_3R внутрішньої мембрани ядерної оболонки нейронів Пуркін'є значно пригнічується, проте це не пов'язано з переходом на якісь інші рівні провідності поодинокого каналу. Причина розбіжностей результатів, отриманих у нашій лабораторії та групою Фоскетта, поки що незрозуміла. Такі розбіжності можуть бути пов'язані зі специфікою структури каналів IP_3R у різних об'єктах (ядрах ооцитів *Xenopus* та центральних нейронів щурів), зі специфікою їх молекулярного оточення або з різницею експериментальних умов.

Дана робота була підтримана Державним фондом фундаментальних досліджень України (грант DFFD F 46.2/001).

Всі експериментальні процедури відповідали положенням Європейської конвенції щодо захисту тварин, які використовуються з дослідницькою метою (86/609/ЄЕС, 1986, Страсбург), і нормативам Комітетів із біоетики Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України та Державної ключової лабораторії молекулярної та клітинної біології.

Автор даної роботи – О. А. Федоренко – підтверджує відсутність будь-яких конфліктів, що стосуються комерційних або фінансових відносин та відносин з організаціями або особами, будь-яким чином пов'язаними з дослідженням.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. M. J. Berridge, M. D. Bootman, and H. L. Roderick, "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, No. 7, 517-529 (2003).
2. D. E. Clapham, "Calcium signalling," *Cell*, **131**, 1047-1058 (2007).
3. C. P. Bengtson and H. Bading, "Nuclear calcium signaling," *Adv. Exp. Med. Biol.*, **970**, 377-405 (2012).

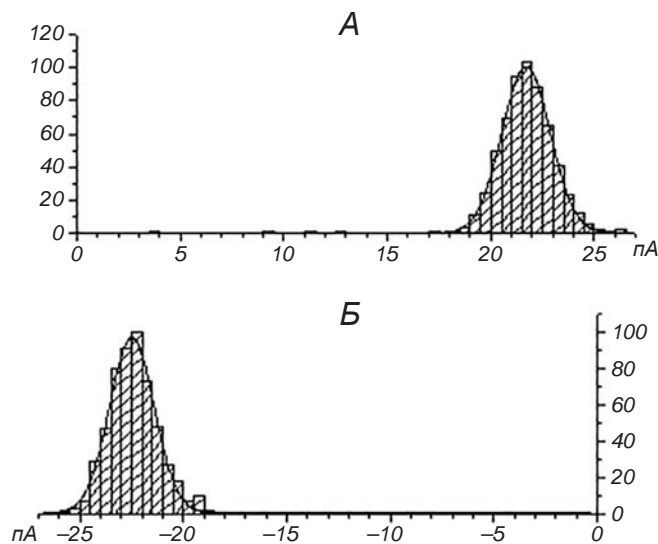


Рис. 2. Гістограми амплітуд струмів (пА) через канал IP_3R при потенціалах $+80$ та -80 мВ (А та Б відповідно).

По осі ординат – кількість спрацьовувань каналу. Наявний лише один рівень провідності такого каналу.

4. M. J. Berridge, "The endoplasmic reticulum: a multifunctional signal organelle," *Cell Calcium*, **32**, Nos. 5/6, 235-249 (2002).
5. M. J. Berridge, "Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms," *Biochim. Biophys. Acta*, **1793**, No. 6, 933-940 (2009).
6. I. Bezprozvanny, "The inositol 1,4,5-trisphosphate receptors," *Cell Calcium*, **38**, 261-272 (2005).
7. J. K. Foskett, C. White, K. H. Cheung, and D. O. D. Mak, "Inositol trisphosphate receptor Ca^{2+} release channels," *Physiol. Rev.*, **87**, 593-658 (2007).
8. A. M. Rossi, S. C. Tovey, T. Rahman, et al., "Analysis of IP_3 receptors in and out of cells," *Biochim. Biophys. Acta*, **1820**, No. 8, 1214-1227 (2012).
9. V. Vanderheyden, B. Devogelaere, L. Missiaen, et al., "Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release by reversible phosphorylation and dephosphorylation," *Biochim. Biophys. Acta*, **1793**, No. 6, 959-970 (2009).
10. I. Bezprozvanny and B. E. Ehrlich, "ATP modulates the function of inositol 1,4,5-trisphosphate-gated channels at two sites," *Neuron*, **10**, No. 6, 1175-1184 (1993).
11. H. Tu, Z. Wang, E. Nosyreva, H. De Smedt, and I. Bezprozvanny, "Functional characterization of mammalian inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms," *Biophys. J.*, **88**, No. 2, 1046-1055 (2005).
12. G. E. Woodard, J. J. López, I. Jardín, et al., "TRPC3 regulates agonist-stimulated Ca^{2+} mobilization by mediating the interaction between type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, RACK1, and Orail," *J. Biol. Chem.*, **285**, No. 11, 8045-8053 (2010).
13. M. J. Fiedler and M. H. Nathanson, "The type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor interacts with protein 4.1N to mediate neurite formation through intracellular Ca waves," *Neurosignals*, **19**, No. 2, 75-85 (2011).
14. K. Mikoshiba, "The discovery and structural investigation of the IP_3 receptor and the associated IRBIT protein," *Adv. Exp. Med. Biol.*, **740**, 281-304 (2012).
15. C. W. Distelhorst and M. D. Bootman, "Bcl-2 interaction with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: role in Ca^{2+} signaling and disease," *Cell Calcium*, **50**, No. 3, 234-241 (2011).
16. D. O. Mak and J. K. Foskett, "Single-channel kinetics, inactivation, and spatial distribution of inositol trisphosphate (IP_3) receptors in *Xenopus* oocyte nucleus," *J. Gen. Physiol.*, **109**, No. 5, 571-587 (1997).
17. L. Stehno-Bittel, A. Lückhoff, and D. E. Clapham, "Calcium release from the nucleus by $InsP_3$ receptor channels," *Neuron*, **14**, No. 1, 163-167 (1995).
18. O. A. Fedorenko, D. E. Duzhyy, and S. M. Marchenko, "Voltage-dependence of IP_3 -receptors of the nuclear envelope of pyramidal neurons of the hippocampus," *Neurophysiology*, **41**, Nos. 5/6, 325-332 (2009).
19. H. Tu, Z. Wang, and I. Bezprozvanny, "Modulation of mammalian inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms by calcium: a role of calcium sensor region," *Biophys. J.*, **88**, No. 2, 1056-1069 (2005).
20. J. K. Foskett and D. O. Mak, "Novel model of calcium and inositol 1,4,5-trisphosphate regulation of $InsP_3$ receptor channel gating in native endoplasmic reticulum," *Biol. Res.*, **37**, No. 4, 513-519 (2004).
21. S. M. Marchenko, V. V. Yarotsky, T. N. Kovalenko, et al., "Spontaneously active and $InsP_3$ -activated ion channels in cell nuclei from rat cerebellar Purkinje and granule neurons," *J. Physiol.*, **565**, 897-910 (2005).
22. O. A. Fedorenko, D. E. Duzhyy, and S. M. Marchenko, "Calcium channels in the nuclear envelope of pyramidal neurons of the hippocampus," *Neurophysiology*, **40**, No. 4, 238-242 (2008).
23. J. P. Humbert, N. Matter, J. C. Artault, et al., "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.*, **271**, No. 1, 478-485 (1996).