

О. А. Федоренко, С. М. Марченко

## Потенціалзалежність активності внутрішньоклітинних іонних каналів нейронів — новий механізм регуляції кальцієвого сигналу

(Представлено академіком НАН України І. С. Магурою)

*В основі внутрішньоклітинних  $\text{Ca}^{2+}$  сигналів лежать локальні короткі вивільнення кальцію з ендоплазматичного ретикулула. Досліджено вплив зміни мембранного потенціалу на активність інозитол-1,4,5-трифосфатних рецепторів ( $\text{IP}_3\text{Rs}$ ) і катіонних каналів великої провідності. З використанням ізольованих ядер нейронів Пуркін'є мозочка та пірамідних нейронів ділянки CA1 гіпокампа як моделі ендоплазматичного ретикулула цих клітин показано, що активність  $\text{IP}_3\text{Rs}$  та катіонних каналів великої провідності, які є основними типами іонних каналів у ядерних мембранах обох типів клітин, потенціалзалежна. Ці канали активуються позитивними потенціалами та блокуються негативними потенціалами у люмені ядерної оболонки. Таке блокування  $\text{IP}_3\text{Rs}$  запобігає подальшому вивільненню  $\text{Ca}^{2+}$ . Ми вважаємо, що ці два типи іонних каналів беруть участь у регуляції  $\text{Ca}^{2+}$  сигналу.*

$\text{Ca}^{2+}$  — важливий вторинний посередник, який регулює численні клітинні процеси [1, 2]. У внутрішньоклітинній регуляції концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  велике значення відіграють інозитол-1,4,5-трифосфатні рецептори ( $\text{IP}_3\text{Rs}$ ), які необхідні для вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з клітинних депо [3, 4]. Порушення  $\text{IP}_3\text{Rs}$ -опосередкованої кальцієвої сигналізації спостерігаються при хворобах Альцгеймера [5] і Хантінгтона [6]. У разі апоптотичних змін білки  $\text{IP}_3\text{Rs}$  “розрізаються” каспазою-3, що призводить до неконтрольованого вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з кальцієвих депо [7]. Шури з нокаутом гена  $\text{IP}_3\text{R1}$  є маложиттєздатними: якщо такі тварини і виживають, то страждають на серйозні неврологічні розлади [8]. Очевидно, що вивчення функціональних властивостей  $\text{IP}_3\text{R}$  є дуже актуальним та перспективним напрямом досліджень.

З літературних джерел відомо, що внутрішньоклітинні кальцієві сигнали складаються з елементарних подій: так званих бліпів (blip), якщо спрацьовує один  $\text{IP}_3\text{R}$ , або пафів (puff), при одночасному відкритті групи близько розташованих  $\text{IP}_3\text{Rs}$  [9, 10]. Механізми активації  $\text{IP}_3\text{Rs}$  їх агоністами ( $\text{IP}_3$  та  $\text{Ca}^{2+}$ ) добре досліджені, проте механізми термінації кальцієвого сигналу залишаються не до кінця з'ясованими. Є декілька гіпотез щодо припинення вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з внутрішньоклітинних депо. По-перше, блокування руху  $\text{Ca}^{2+}$  може відбуватися внаслідок зменшення електрохімічного градієнта для нього за рахунок спустошення кальцієвого депо. По-друге, є припущення, що інгібування  $\text{IP}_3\text{Rs}$  відбувається завдяки підвищенню концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  біля зовнішньої частини рецептора, де, як вважають, знаходиться його інгібуючий центр [4]. Ми не відкидаємо можливість того, що ці явища дійсно мають місце у регуляції кальцієвого сигналу. Крім того, у даній роботі на підставі результатів дослідження впливу зміни мембранного потенціалу на активність  $\text{IP}_3\text{Rs}$  і катіонних каналів великої провідності ми зробили припущення про ще один можливий механізм термінації вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$ .

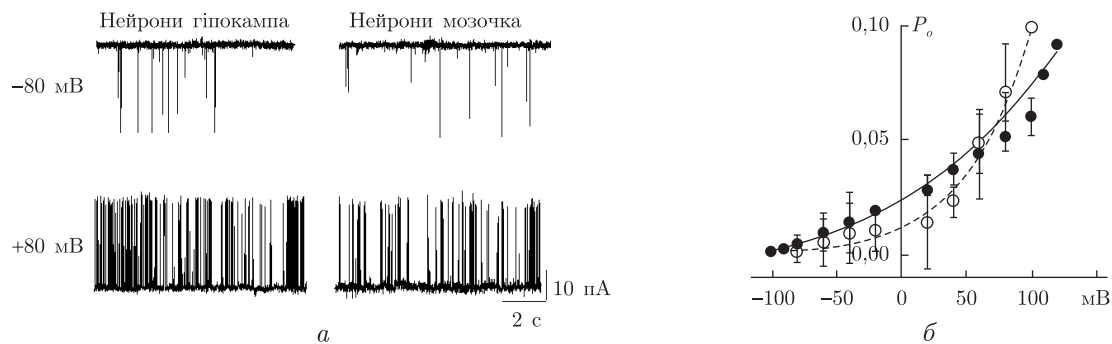


Рис. 1. Залежність активності  $IP_3Rs$  від потенціалу: оригінальні записи активності каналів (а) та залежність вірогідності відкритого стану ( $P_o$ )  $IP_3Rs$  ядерної оболонки нейронів Пуркінє (1) та пірамідних нейронів (2) від мембранного потенціалу (б)

В експериментах ми використовували описані раніше [11, 12] методи ізоляції ядер нейронів та петч-клемп у конфігурації “nucleus-attached” або “excised patches” у режимі фіксації потенціалу.

З наших попередніх робіт відомо, що  $IP_3Rs$  ядерної оболонки нейронів Пуркінє мозочка та пірамідних нейронів ділянки СА1 гіпокампа знаходяться лише на внутрішній мембрані [11–13].  $IP_3Rs$  ядерної оболонки нейронів цих двох типів мали однакові провідність, селективність, характер роботи та кінетику активації, тому можна стверджувати, що в обох випадках ми мали справу з одним і тим самим типом іонних каналів, а саме з  $IP_3Rs$  I типу [4].

У своїх попередніх дослідженнях на мембранах ядерної оболонки пірамідних нейронів ділянки СА1 гіпокампа [12, 13] ми помітили, що вірогідність відкритого стану  $IP_3Rs$  ( $P_o$ ) залежить від потенціалу. Зокрема, на позитивних потенціалах активність каналів була значно вищою, а на негативних вона значно зменшувалася. Цілковито ідентичну картину ми спостерігали й у випадку  $IP_3Rs$  нейронів Пуркінє (рис. 1, а). Зменшення  $P_o$  було зумовлено як зміною частоти спрацьовувань каналу, так і тривалістю його відкритого стану. Характер потенціалзалежності роботи  $IP_3Rs$  обох типів нейронів був однаковий (див. рис. 1, б), проте для каналів пірамідних нейронів він був більш виражений. На потенціалах  $\leq -80$  мВ  $IP_3Rs$  гіпокампа повністю, але зворотно блокувалися, чого не спостерігалось у випадку з нейронами Пуркінє.

Крім  $IP_3Rs$  на внутрішній мембрані ядерної оболонки пірамідних нейронів ділянки СА1 гіпокампа і нейронів Пуркінє мозочка у великій кількості були виявлені іонні канали, селективні до моновалентних катіонів з провідністю близько 200 пСм [14]. Катіонні канали, які були зареєстровані на внутрішній ядерній мембрані нейронів Пуркінє мозочка та пірамідних нейронів ділянки СА1 гіпокампа, мали подібні основні біофізичні властивості [11, 14].

Досі відсутні наочні результати дослідження функцій катіонних каналів великої провідності, але ми припускаємо, що вони необхідні для регуляції тривалості активності  $IP_3Rs$ . Струм одновалентних катіонів, який спрямований в протилежний бік від струму іонів  $Ca^{2+}$  при вивільненні з депо, перешкоджає дуже різкому зниженню потенціалу в люмені і таким чином збільшує тривалість кальцієвого сигналу.

У наших дослідках ми помітили, що катіонні канали великої провідності у більшості випадків знаходяться поруч з  $IP_3Rs$  і можна спостерігати роботу цих двох типів іонних

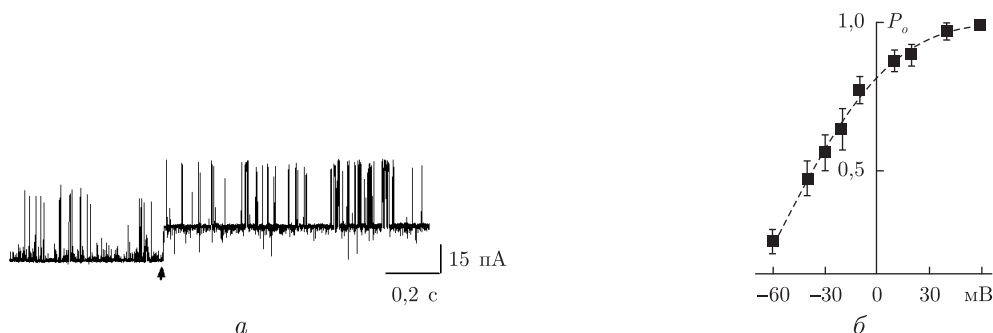


Рис. 2. Активність  $IP_3$ -рецептора та катіонного каналу великої провідності у внутрішній ядерній мембрані пірамідних нейронів CA1 ділянки гіпокампа при потенціалі +60 мВ у симетричному розчині KCl (стрілка вказує на відкриття катіонного каналу) (а) та залежність вірогідності відкритого стану ( $P_o$ ) катіонного каналу великої провідності ядерної оболонки нейронів Пуркінє від мембранного потенціалу (б)

каналів одночасно (рис. 2, а). Крім того, активність катіонних каналів також залежала від потенціалу і на негативних його значеннях вона істотно зменшувалась (див. рис. 2, б). Ці канали були майже весь час відкритими ( $P_o > 0,8$ ) при позитивних потенціалах. У випадку негативних значень потенціалу, а саме  $\leq -40$  мВ для нейронів ділянки CA1 гіпокампа та  $\leq -60$  мВ для нейронів Пуркінє мозочка, ці канали повністю та зворотно блокувались.

Отже, проведені дослідження показали, що катіонні канали великої провідності та  $IP_3Rs$ , які були зареєстровані у внутрішній мембрані ядерних оболонок нейронів Пуркінє мозочка та пірамідних нейронів ділянки CA1 гіпокампа, мають чітку потенціалзалежність ідентичного характеру. При негативних потенціалах активність обох типів каналів істотно зменшується. Цей факт, а також колокалізація іонних каналів даних двох типів дають підставу вважати, що катіонні канали великої провідності та  $IP_3Rs$  можуть мати спільну функцію, а саме — вивільнення  $Ca^{2+}$  з ядерної оболонки.

Ми припускаємо, що потенціалзалежне інгібування  $IP_3Rs$  може бути одним з механізмів обмеження тривалості  $Ca^{2+}$  сигналу в ядрі. Вивільнення  $Ca^{2+}$  із внутрішньоклітинних депо, наприклад ядерної оболонки, спряжене з перенесенням великого електричного заряду крізь її мембрану та спричиняє появу негативного потенціалу в перинуклеарному просторі. Як показали наші дослідження, при негативних потенціалах активність катіонних каналів великої провідності у внутрішній мембрані ядер пірамідних нейронів гіпокампа та нейронів Пуркінє мозочка значно зменшується, і вони поступово інгібуються.

Блокування негативним потенціалом струму  $K^+$  призводить до ще більшого зниження потенціалу в перинуклеарному просторі. При досягненні значних негативних значень мембранного потенціалу починається зниження активності з поступовим повним блокуванням  $IP_3Rs$  і припиняється вивільнення  $Ca^{2+}$  з депо.

Таким чином, можна припустити, що  $IP_3Rs$  та малоселективні катіонні канали великої провідності утворюють мінімальну систему для функціонування ядерної оболонки як кальцієвого депо та відіграють важливу роль у регуляції тривалості  $Ca^{2+}$  сигналу всередині ядра.

*Робота виконана за фінансової підтримки ДФФД, грант F46.2/001.*

1. Berridge M. J., Bootman M. D., Roderick H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodeling // Nature Rev. Mol. Cell Biol. – 2003. – 4. – P. 517–529.

2. Clapham D. E. Calcium signalling // Cell. – 2007. – **131**. – P. 1047–1058.
3. Iino M. Identification of new functions of Ca<sup>2+</sup> release from intracellular stores in central nervous system // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2008. – **369**. – P. 220–224.
4. Bezprozvanny I. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptors // Cell Calcium. – 2005. – **38**. – P. 261–272.
5. LaFerla F. M. Calcium dyshomeostasis and intracellular signaling in Alzheimer's disease // Nat. Rev. Neurosci. – 2002. – **3**. – P. 862–872.
6. Bezprozvanny I., Hayden M. R. Deranged neuronal calcium signaling and Huntington disease // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2004. – **322**. – P. 1310–1317.
7. Assefa Z., Bultynck G., Szlufcik K. et al. Caspase-3-induced truncation of type 1 inositol trisphosphate receptor accelerates apoptotic cell death and induces inositol trisphosphate-independent calcium release during apoptosis // J. Biol. Chem. – 2004. – **279**. – P. 43227–43236.
8. Kume S. Role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in early embryonic development // Cell Mol. Life Sci. – 1999. – **56**, No 3/4. – P. 296–304.
9. Bootman M. D., Lipp P., Berridge M. J. The organization and functions of local Ca<sup>2+</sup> signals // J. Cell Sci. – 2001. – **114**. – P. 2213–2222.
10. Berridge M. J. Elementary and global aspects of calcium signaling // J. Exp. Biol. – 1997. – **200**. – P. 315–319.
11. Marchenko S. M., Yarotsky V. V., Kovalenko T. N. et al. Spontaneously active and InsP<sub>3</sub>-activated ion channels in cell nuclei from rat cerebellar Purkinje and granule neurones // J. Physiol. – 2005. – **15**, No 565. – P. 897–910.
12. Fedorenko O. A., Duzhy D. E., Marchenko S. M. Calcium channels in the nuclear envelope of pyramidal neurons of the hippocampus // Neurophysiology. – 2008. – **40**, No 4. – P. 238–242.
13. Fedorenko O. A., Duzhy D. E., Marchenko S. M. Ca<sup>2+</sup> channels in the nuclear membrane of hippocampal pyramidal neurons // Acta Physiol. – 2006. – **186**. – P. 183.
14. Fedorenko O. A., Marchenko S. M. Spontaneously Active Ion Channels of the Nuclear Envelope Membrane // Intern. J. Physiol. & Pathophysiol. – 2011. – **2**, No 2. – P. 183–195.

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця  
 НАН України, Київ  
 Державна ключова лабораторія молекулярної  
 та клітинної біології, Київ

Надійшло до редакції 13.02.2012

**Е. А. Федоренко, С. М. Марченко**

### **Потенциалозависимость активности внутриклеточных ионных каналов нейронов — новый механизм регуляции кальциевого сигнала**

*В основе внутриклеточных Ca<sup>2+</sup> сигналов лежат локальные короткие выделения кальция из эндоплазматического ретикулума. Исследовано влияние изменения мембранного потенциала на активность инозитол-1,4,5-трифосфатных рецепторов (IP<sub>3</sub>Rs) и катионных каналов большой проводимости. С использованием изолированных ядер нейронов Пуркинье мозжечка и пирамидных нейронов области CA1 гиппокампа как модели эндоплазматического ретикулума этих клеток показано, что активность IP<sub>3</sub>Rs и катионных каналов большой проводимости, которые являются основными типами ионных каналов в ядерных мембранах обоих типов клеток, потенциалозависима. Эти каналы активируются позитивными потенциалами и блокируются негативными потенциалами в люмене ядерной оболочки. Такое блокирование IP<sub>3</sub>Rs предотвращает дальнейшее выделение Ca<sup>2+</sup>. Мы считаем, что эти два типа ионных каналов принимают участие в регуляции Ca<sup>2+</sup> сигнала.*

O. A. Fedorenko, S. M. Marchenko

**The voltage-dependence of the intracellular ion channels of neurons —  
a new mechanism of Ca<sup>2+</sup> signal regulation**

*Intracellular IP<sub>3</sub>-activated Ca<sup>2+</sup> signals consist of local short releases of Ca<sup>2+</sup> from endoplasmic reticulum. The mechanism of activation of these events is well studied, but much less is known about ways of its inactivation. We used the nuclear envelopes isolated from Purkinje neurons of cerebellum and pyramidal neurons from area CA1 of hippocampus as a model of the endoplasmic reticulum of these cells. Our data demonstrate that the activity of IP<sub>3</sub>-activated Ca<sup>2+</sup> and large conductance cationic channels, which are the major types of ion channels in the nuclear membrane of both types of cells, is voltage-dependent. These ion channels are activated by positive potentials and inhibited by negative potentials in the nuclear envelope lumen. This voltage-dependent inhibition of IP<sub>3</sub> receptors prevents any further Ca<sup>2+</sup> release. We suggest that these two types of ion channels take part in the regulation of Ca<sup>2+</sup> signals.*