



УДК 577.352

© 2012

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

Вплив міжмолекулярної взаємодії на функціональні властивості інозитолтрифосфатних рецепторів ядерних мембран нейронів

(Представлено академіком НАН України І. С. Магурою)

В основі внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації, яка відіграє важливу роль у різноманітних фізіологічних та патологічних процесах, лежить активність інозитол-1,4,5-трифосфатних рецепторів ($InsP_3Rs$). У даному дослідженні з використанням ізолюваних ядер клітин Пуркін'є мозочка щурів показано, що кластеризація $InsP_3Rs$ призводить до значного збільшення їх активності, зокрема зростає вірогідність їх відкритого стану. Причому наші дані вказують на те, що причиною цього підвищення активності каналів є алостеричні взаємодії між близькорозташованими $InsP_3Rs$. Таким чином, утворення кластера підвищує вірогідність відкритого стану каналу і, відповідно, збільшує амплітуду кальцієвого сигналу.

Кальцієва сигналізація відіграє важливу роль у різноманітних внутрішньоклітинних фізіологічних та патологічних процесах [1, 2]. Відомо, що порушення у механізмах регуляції концентрації Ca^{2+} в нейронах мають істотне значення у розвитку нейродегенеративних захворювань, таких як хвороба Альцгеймера, хвороба Хантінгтона, цереброспінальна атаксія тощо [3–5].

Одну з ключових ролей у регуляції внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації відіграють інозитол-1,4,5-трифосфатні рецептори ($InsP_3Rs$) [6–8]. Вони необхідні для вивільнення Ca^{2+} із клітинних депо у відповідь на підвищення концентрації інозитолтрифосфату в результаті дії різноманітних стимулів [6]. Активація $InsP_3Rs$ призводить до генерації так званих бліпів (коли активні лише поодинокі $InsP_3Rs$) або пафів (коли активуються згруповані у кластері рецептори), або кальцієвих хвиль, які поширюються на всю клітину [7, 8].

У своїх попередніх роботах ми показали, що $InsP_3Rs$ у великій кількості знаходяться на внутрішній мембрані ядер нейронів Пуркін'є мозочка щурів [9], тому в даній роботі ми використовували ізолювані ядра саме цього типу клітин (детально метод ізоляції ядер нейронів описаний у [9]).

Дослідження струмів через поодинокі канали $InsP_3Rs$ проводили з використанням методу петч-клемп у конфігурації “nucleus-attached” або “excised patches” у режимі фіксації

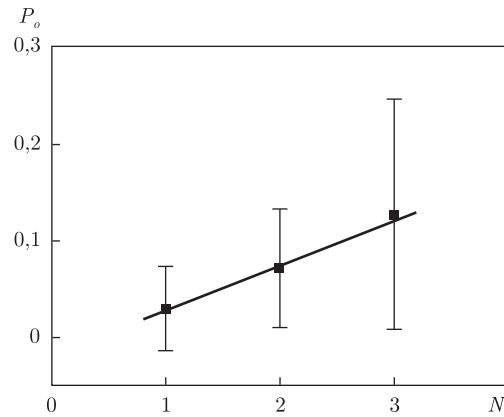


Рис. 1. Залежність середнього значення вірогідності відкритого стану каналу (P_o) від загальної кількості каналів у петчі (N — кількість каналів)

потенціалу. Для того щоб зареєструвати роботу InsP_3Rs , ми додавали до розчину в робочій камері АТФ — 0,5 ммоль/л та інозитолтрифосфату — 1 мкмоль/л, що вважається оптимальним для активації InsP_3Rs [6]. Концентрація вільного Ca^{2+} у цьому розчині становила 150–170 нмоль/л. 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”. Статистична вірогідність результатів визначалася за критерієм t Стьюдента ($P < 0,05$ вважалось статистично вірогідним).

При аналізі роботи активованих InsP_3Rs було помічено, що вірогідність відкритого стану каналу (P_o) залежала від кількості рецепторів в петчі (ділянка мембрани, обмежена петч-піпеткою). Зокрема, було чітко продемонстровано, що збільшення кількості каналів у петчі під час реєстрації їх активності призводило до значного росту середнього значення P_o (рис. 1). Проте, коли ми досліджували активність декількох каналів (більше одного), то середнє значення отримували з великою похибкою. Тому наступним нашим кроком був більш детальний аналіз розподілу значень P_o , для чого поділили всі отримані записи активності InsP_3Rs за кількістю активних каналів. Виявилось, що для однакового числа каналів у петчі ми спостерігали різні P_o (рис. 2).

Цю розбіжність ми спробували пояснити різними варіантами кластеризації InsP_3Rs на досліджуваній ділянці мембрани. У петчах, які містили один рецептор, вірогідність відкритого стану InsP_3Rs становила $P_o \approx 0,03$. Петчі, що містили два рецептори, за вірогідністю відкритого стану InsP_3Rs чітко ділилися на дві групи, одна з яких мала середнє значення $P_o \approx 0,028$, що практично збігається з вірогідністю відкритого стану групи з одним рецептором і свідчить про те, що в даній групі канали були не залежні один від одного. В той же час друга група мала набагато більшу вірогідність відкритого стану ($P_o \approx 0,115$), що, очевидно, відповідає кластеру із двох взаємопов’язаних рецепторів.

Для петча з трьома каналами картина ще більше ускладнювалася. Тут канали за вірогідністю відкритого стану діляться на три групи: 1) група із низькою вірогідністю відкритого стану ($P_o \approx 0,03$), що достовірно не відрізняється від P_o для поодиноких каналів; 2) група, яка мала проміжне положення з $P_o \approx 0,1$, що приблизно відповідає кластеру з двох каналів; 3) група петчів, де вірогідність відкритого стану каналів збільшувалась у декілька разів і $P_o \approx 0,26$, що, ймовірно, відповідає кластеру з трьох каналів.

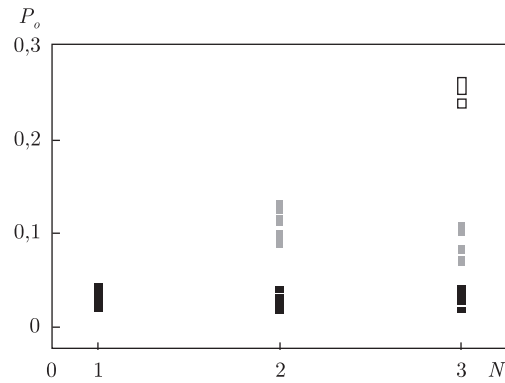


Рис. 2. Значення вірогідності відкритого стану (P_o) каналу при різній кількості каналів у петчі: чорним позначені поодинокі канали, сірим — кластери з двох каналів, білим — кластери з трьох каналів (N — кількість каналів)

Збільшення вірогідності відкритого стану каналу в петчах, що містять більше ніж один рецептор, вказують на взаємодію між каналами, тобто один канал деяким чином впливає на P_o іншого.

Було чітко показано, що InsP₃Rs у кластері взаємодіють під впливом кальцію, який виділяється через відповідні канали під час їх активації [7]. Тобто активність одного InsP₃Rs призводить до виділення кальцію, що в результаті активує сусідні рецептори. Але в поставлених нами експериментальних умовах по обидва боки мембрани знаходилися розчини з однаковим вмістом Ca²⁺. Таким чином, відкриття каналу InsP₃Rs не могло бути викликане збільшеною концентрацією Ca²⁺ з іншого боку мембрани. Відповідно, кальцієвий механізм взаємодії між рецепторами був неможливий.

Альтернативною можливістю пояснити це явище є алостерична взаємодія між зв'язаними рецепторами у кластері. В цьому випадку конформаційні зміни, які відбувалися з молекулою каналу при його відкриванні, впливають на сусідні канали, збільшують вірогідність їх відкритого стану. Наявність такого тісного контакту між InsP₃Rs створює можливість для активації цілого кластера при спрацьовуванні лише одного каналу, а, отже, і генерації значного кальцієвого сигналу.

Таким чином, кластеризація не просто зближує рецептори, але й призводить до зміни механізму їх роботи. Утворення кластера підвищує вірогідність відкритого стану кожного каналу і, відповідно, збільшує амплітуду кальцієвого сигналу.

Дослідження виконані в Державній ключовій лабораторії молекулярної та клітинної біології (грант ДФФД 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. Bezprozvanny I. Role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in pathogenesis of Huntington's disease and spinocerebellar ataxias // *Neurochem Res.* – 2011. – **36**. – P. 1186–1197.
4. LaFerla F. M. Calcium dyshomeostasis and intracellular signaling in Alzheimer's disease // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2002. – **3**. – P. 862–872.
5. Foskett J. K. Inositol trisphosphate receptor Ca²⁺ release channels in neurological diseases // *Pflugers Arch.* – 2010. – **460**. – P. 481–494.
6. Bezprozvanny I. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptors // *Cell Calcium.* – 2005. – **38**. – P. 261–272.
7. Bootman M. D., Lipp P., Berridge M. J. The organization and functions of local Ca²⁺ signals // *J. Cell Sci.* – 2001. – **114**. – P. 2213–2222.

8. Berridge M. J. Elementary and global aspects of calcium signaling // J. Exp. Biol. – 1997. – **200**. – P. 315–319.
9. Marchenko S. M., Yarotsky V. V., Kovalenko T. N. et al. Spontaneously active and InsP_3 -activated ion channels in cell nuclei from rat cerebellar Purkinje and granule neurons // J. Physiol. – 2005. – **15**, No 565. – P. 897–910.

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця
НАН України, Київ

Надійшло до редакції 16.05.2012

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

Влияние межмолекулярного взаимодействия на функциональные свойства инозитолтрифосфатных рецепторов ядерных мембран нейронов

В основе внутриклеточной кальциевой сигнализации, которая играет важную роль в различных физиологических и патологических процессах, лежит активность инозитол-1,4,5-трифосфатных рецепторов (InsP_3Rs). В данной работе с использованием изолированных ядер клеток Пуркинье мозжечка крыс показано, что кластеризация InsP_3Rs приводит к значительному увеличению их активности, в частности, к возрастанию вероятности их открытого состояния. Причем наши данные указывают на то, что причиной этого повышения активности каналов являются аллостерические взаимодействия между близко расположенными InsP_3Rs . Таким образом, формирование кластера увеличивает вероятность открытого состояния канала и, соответственно, приводит к возрастанию амплитуды кальциевого сигнала.

O. A. Fedorenko, O. V. Lunko, S. M. Marchenko

The effect of intermolecular interaction on the functional properties of inositol-triphosphate receptors of the nuclear membranes of neurons

The activity of inositol-1,4,5-triphosphate receptors (InsP_3Rs) is a base of the intercellular calcium signalization, which plays an important role in different physiological and pathological processes. We used the isolated nuclei of Purkinje cells from the rat cerebellum. Our results show that the clusterization of InsP_3Rs leads to the essential increase of their activity and, in particular, to the growth of the open state probability for their channels. We have demonstrated that the channel activity increases by the allosteric interaction of near situated InsP_3Rs . Thus, the formation of clusters increases the probability of the opened state of the channel and enhances the amplitude of a calcium signal.