

ЗНАЧЕННЯ КАТІОННИХ КАНАЛІВ ДЛЯ ФУНКЦІОНУВАННЯ ЯДЕРНОЇ ОБОЛОНКИ НЕЙРОНІВ ЯК КАЛЬЦІЄВОГО ДЕПО

Надійшла 25.04.10

Продовженням ядерної оболонки клітин еукаріот є мембрана ендоплазматичного ретикула; обидва вказані компартменти можуть виконувати функцію внутрішньоклітинних кальцієвих депо. За допомогою методу петч-клемп ми дослідили біофізичні властивості каналів, експресованих у внутрішніх ядерних мембранах пірамідних нейронів ділянки CA1 гіпокампа шурів, зокрема катіонних каналів великої провідності та кальцієвих каналів інозитолтрифосфатних рецепторів – основних каналів у мембранах цього типу. Згідно з результатами вимірювань, активність каналів обох типів демонструє чітку потенціалзалежність. Вірогідність їх відкритого стану (P_o) залежить від потенціалу всередині люмену ядерної оболонки: при позитивних потенціалах активність згаданих каналів є значно інтенсивнішою, ніж при негативних. Більш того, у разі значних негативних потенціалів канали обох типів зворотно блокуються. Ми вважаємо, що ця властивість іонних каналів ядерної оболонки є істотним фактором, відповідальним за регуляцію перебігу кальцієвих сигналів у ядрі. Запропоновано гіпотезу про механізм термінації вивільнення Ca^{2+} із внутрішньоклітинних депо, який базується на специфіці потенціалзалежності іонних каналів вказаних типів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: пірамідні нейрони гіпокампа, ядерна оболонка, ендоплазматичний ретикулум, кальцієві депо, інозитолтрифосфатні рецептори, катіонні канали великої провідності.

ВСТУП

Вважається, що зміни синаптичної пластичності пірамідних нейронів гіпокампа, зокрема його ділянки CA1, відіграють істотну роль у механізмах навчання та пам'яті. З цієї обставиною значною мірою пов'язаний великий інтерес до гіпокампа як об'єкта нейрофізіологічних досліджень [1, 2].

Слід визнати, що механізми утворення довготривалої потенціації (ДТП, long-term potentiation, LTP) та довготривалої депресії (ДТД, long-term depression, LTD) синаптичної передачі досі залишаються значною мірою невідомими. Згідно з однією з найбільш популярних гіпотез, роль провідного фактора в цих процесах належить змінам концентрації іонів кальцію в клітині та її компартментах. Зокрема, було чітко продемонстровано, що індукція як ДТП, так і ДТД істотно залежить від концентрації іонів Ca^{2+} у цитоплазмі [3, 4]. Підвищення цієї концентрації може бути забезпечено двома шляха-

ми: по-перше, надходженням іонів Ca^{2+} до клітини завдяки активації кальцієвих каналів плазматичної мембрани (наприклад, каналів NMDA-рецепторів), а по-друге – вивільненням кальцію із внутрішньоклітинних кальцієвих депо.

Було встановлено, що пізня фаза розвитку синаптичної пластичності потребує синтезу певних досі відсутніх протеїнів [5, 6]. Це вказує на особливе значення регуляції концентрації іонів Ca^{2+} в ядрі клітини, де знаходяться кальційзалежні фактори транскрипції, наприклад CREB [7–9]. Зміни експресії таких факторів безпосередньо впливають на постсинаптичні феномени та, кінець кінцем, на формування пам'яті [10, 11].

Результати досліджень останніх років показали наявність в ядерній оболонці низки іонних каналів [12–20], серед яких найбільшу увагу привертають канали інозитол-1,4,5-трифосфатних (IP_3 -) рецепторів. Активація останніх, як відомо, необхідна для вивільнення іонів Ca^{2+} із внутрішньоклітинних депо. Таким чином, IP_3 -рецептори відіграють визначальну роль у кальцієвій сигналізації в клітинах усіх типів [21]. Проте досі достеменно не відомо, які саме

¹ Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).
Ел. пошта: elena.fedorenko@biph.kiev.ua (О. А. Федоренко).

конкретні властивості іонних каналів ядерних мембран можуть бути важливими для регуляції перебігу кальцієвих сигналів.

У даній роботі ми спробували визначити, як властивості катіонних каналів у мембранах ядерної оболонки клітин гіпокампа, зокрема потенціал-залежність цих каналів, можуть впливати на кальцієві сигнали в ядрі.

МЕТОДИКА

Отримання ізольованих ядер пірамідних нейронів гіпокампа. Всі експериментальні процедури проводилися відповідно до біоетичних норм законодавства України. Для дослідів брали самців щурів лінії Вістар або Фішер віком два-три тижні. Тварин декапітували, після чого великі півкулі головного мозку виділяли та вміщували в охолоджений (1–4 °C) розчин наступного складу (у мілімолях на 1 л): NaCl – 120, KCl – 2.5, MgSO₄ – 1.3, CaCl₂ – 1, NaH₂PO₄ – 1.3, NaHCO₃ – 26, глюкоза – 10 (pH 7.3).

З однієї півкулі швидко ізольовали гіпокамп, та виготовляли з нього тонкі зрізи (завтовшки до 400 мкм). Отримані зрізи поміщали в розчин, що вміщував (у мілімолях на 1 л): глюконат калію – 150, HEPES – 2.5, HEPES-K – 2.5 (pH 7.3). До розчину додавали „коктейль” протеїнових інгібіторів („Roche Diagnostics”, Велика Британія) у концентраціях, зазначених виробником. Шар, в якому знаходилися семи пірамідних нейронів гіпокампа, обережно виділяли під бінокулярно з використанням мікрохірургічної техніки. Після цього зразки тканини гомогенізували за допомогою пропускання через трубку з нержавіючої сталі з внутрішнім діаметром 0.64 мм.

Для забезпечення можливості петч-клемп-реєстрацій струмів через внутрішню мембрану ядерної оболонки отримані препарати інкубували протягом 20–30 хв з повільним перемішуванням у 1 %-вому розчині цитрату натрію з додаванням 5 мМ діетилтриетолу. Було показано, що дана процедура призводить до усунення зовнішньої ядерної оболонки, причому без істотного пошкодження внутрішньої [22]. Отже, оброблені цитратом ядра втрачали свою зовнішню мембрану, і таким чином внутрішня мембрана ставала досяжною для петч-піпетки.

Отриманий гомогенат розміщували в робочій камері, обладнаній інвертованим мікроскопом. Через деякий час ядра осідали та щільно прикріплювалися до дна камери, після чого залишки інших органел та ушкоджені ядра відмивали розчином, що вміщував (у мілімо-

лях на 1 л): KCl – 150, HEPES – 2.5, HEPES-K – 2.5 (pH 7.3).

Електрофізіологічні дослідження. Активність поодиноких іонних каналів внутрішньої ядерної оболонки реєстрували з використанням методу петч-клемп у конфігурації “nucleus-attached” або “excised patches” у режимі фіксації потенціалу. Досліди проходили при температурі 18–20 °C. Петч-піпетки були виготовлені з боросилікатного скла (“Shutter Instruments”, США); їх опір варіював від 5 до 12 МОм. Внутрішньопіпетковий розчин містив у собі (у мілімолях на 1 л): KCl – 150, Na₂ATP – 0.5, K₂EGTA – 0.53, CaEGTA – 1.47 (це забезпечувало концентрацію вільного Ca²⁺ на рівні 250 нМ) та HEPES-KOH – 10 (pH 7.3). Для активації IP₃-рецепторів до розчину додавали 10 мкМ інозитол-1,4,5-трифосфату.

Референтний електрод (Ag-AgCl) був сполучений з робочою камерою через агаровий місток. Ванночка заповнювалася контрольним (базовим) розчином, проте останній міг замінюватися на інші розчини залежно від мети дослідів. Використовували підсилювач Visual Patch VP-500 (“Bio-Logic”, Франція). Сигнали з підсилювача піддавали фільтрації за допомогою низькочастотного фільтра Бессела (частота зрізу 2 кГц), оцифровували з частотою 10⁴ с⁻¹ та зберігали на жорсткому диску комп’ютера. Отримані результати були проаналізовані за допомогою програми “pClamp 9.0” (“Axon Instruments”, США). На рисунках у всіх випадках вказується електричний потенціал, котрий відводився піпеткою, а потенціал базового розчину приймався за 0 мВ.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як ми зазначали в своїх попередніх роботах, петч-клемп-відведення від мембран ядерної оболонки ізольованих ядер пірамідних нейронів ділянки CA1 гіпокампа (рис. 1) дозволили виявити іонні канали декількох типів з різними біофізичними властивостями [15].

Серед цих каналів нас найбільш зацікавили кальцієві канали IP₃-рецепторів та катіонні канали великої провідності, селективні щодо моновалентних катіонів. Канали обох типів експресуються у внутрішній ядерній мембрані нейронів даного типу (рис. 2). Крім того, одночасну активність каналів двох зазначених типів часто можна було спостерігати в одній і тій самій ділянці (петчі) під час петч-клемп-відведень (рис. 3). Це дає підстави стверджувати, що кальцієві канали IP₃-рецепторів та катіонні канали великої провідності розташовані на вну-

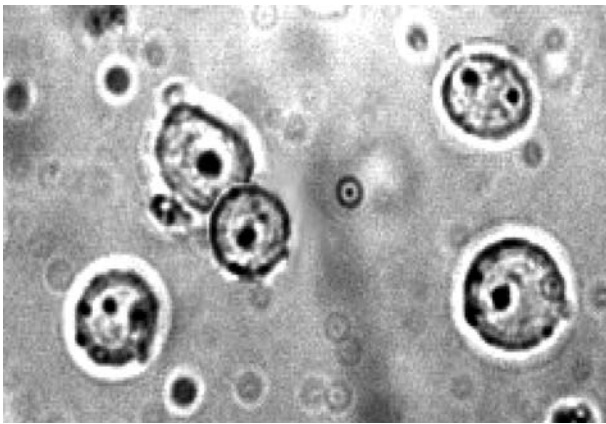


Рис. 1. Ядра нейронів ділянки CA1 гіпокампа, отримані після гомогенізації зразка шару тканини, в якому були розташовані соми пірамідних клітин.

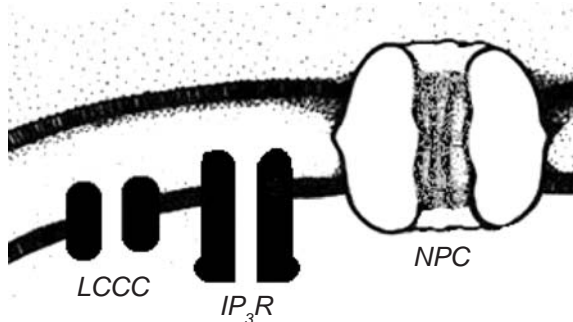


Рис. 2. Схематичне зображення ядерної оболонки, яка складається з двох мембран, сполучених у межах комплексу ядерної пори (NPC).

Підкреслено, що інозитолтрифосфатні (IP_3 -) рецептори (IP_3R) локалізовані на внутрішній мембрані поруч із катіонними каналами великої провідності (LCCC).

трішній ядерній мембрані в безпосередній близькості одні до одних. З урахуванням вказаної обставини можна було припустити, що дані канали задіяні у виконання подібних функцій та здатні взаємовпливати.

Результати попереднього детального дослідження біофізичних властивостей IP_3 -рецепторів у внутрішній мембрані ядер пірамідних нейронів гіпокампа свідчили про те, що активність каналів зазначених рецепторів істотно залежить від мембранного потенціалу [23]. Вимірювання, виконані в перебігу нашої роботи, засвідчили, що вірогідність відкритого стану (P_o) каналів IP_3 -рецепторів внутрішньої ядерної мембрани при позитивних потенціалах на цій мембрані була набагато вищою, ніж при негативних (рис. 4, А). Більш того, у разі потенціалів нижче -60 мВ провідність через канали IP_3 -рецепторів внутрішньої ядерної мембрани пірамідних нейронів гіпокампа цілком блокувалася (Б).

Активність катіонних каналів великої провідності в згаданій мембрані, як і каналів IP_3 -рецепторів, також залежала від потенціалу. При його позитивних значеннях такі канали майже постійно були відкритими ($P_o > 0.8$), а при негативних їх P_o різко зменшувалася (рис. 5, А). У разі потенціалів -40 мВ та нижче вказані канали швидко та повністю блокувалися. Таке інгібування було цілком зворотним (Б).

Ми вже згадували про припущення, що IP_3 -рецептори та катіонні канали великої провідності мають важливе значення для виконання спільної функції. З урахуванням даних, отриманих у нашій роботі, ми пропонуємо гіпотезу про механізм регуляції кальцієвого сигналу, який базується на ви-

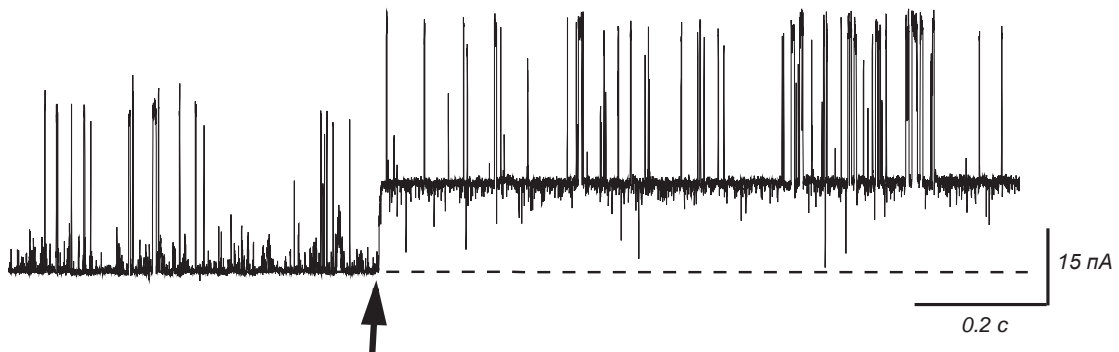


Рис. 3. Запис активності іонних каналів двох типів у внутрішній ядерній мембрані пірамідних нейронів гіпокампа при потенціалі 60 мВ.

Стрілкою вказаний момент відкриття катіонного каналу великої провідності. Активований інозитолтрифосфатом канал функціонує протягом усього часу реєстрації.

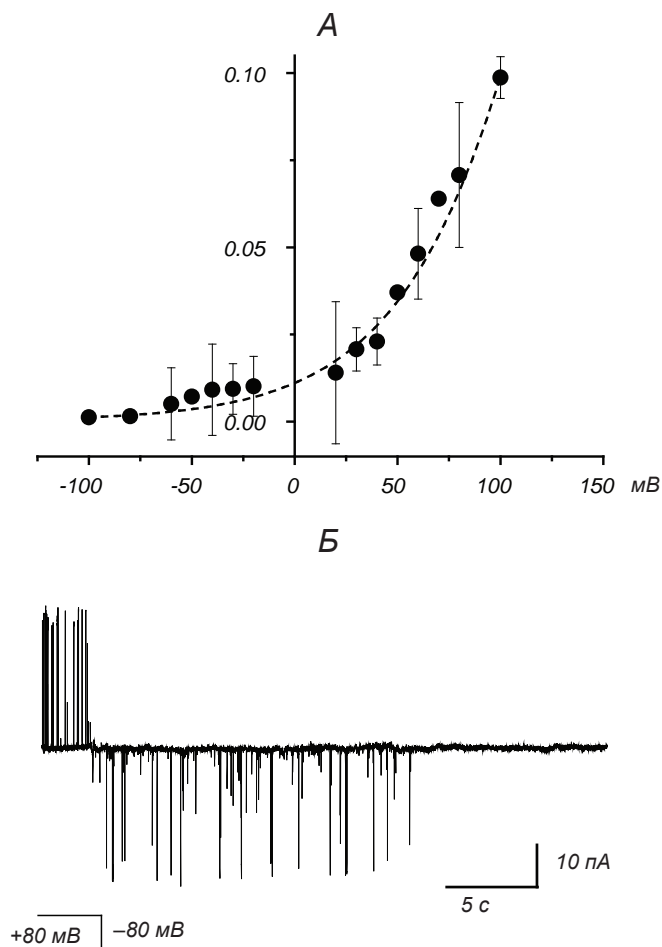


Рис. 4. Залежність вірогідності відкритого стану (P_o) каналів інозитолтрифосфатних рецепторів від мембранного потенціалу (мВ, *A*) та повне блокування цих каналів при потенціалі -80 мВ (*B*).

сокій потенціалзалежності активності катіонних каналів ядерної оболонки (рис. 6). Як відомо, інозитолтрифосфат та іони Ca^{2+} , концентрація яких у клітині під час надходження різноманітних стимулів збільшується, активують IP_3 -рецептори [21, 24]. Це призводить до генерації локальних (так звані бліпи або пафи) або глобальних (кальцієві хвилі) кальцієвих сигналів [25–27]. Очевидно, що вивільнення Ca^{2+} із депо пов'язано з перенесенням досить великого електричного заряду через відповідні мембрани. Якщо перинуклеарний простір у клітині виконує функцію одного із кальцієвих депо, такий процес буде супроводжуватися появою істотного негативного потенціалу в цьому просторі [28, 29]. Потік одновалентних катіонів, який виникає внаслідок активації катіонних каналів великої

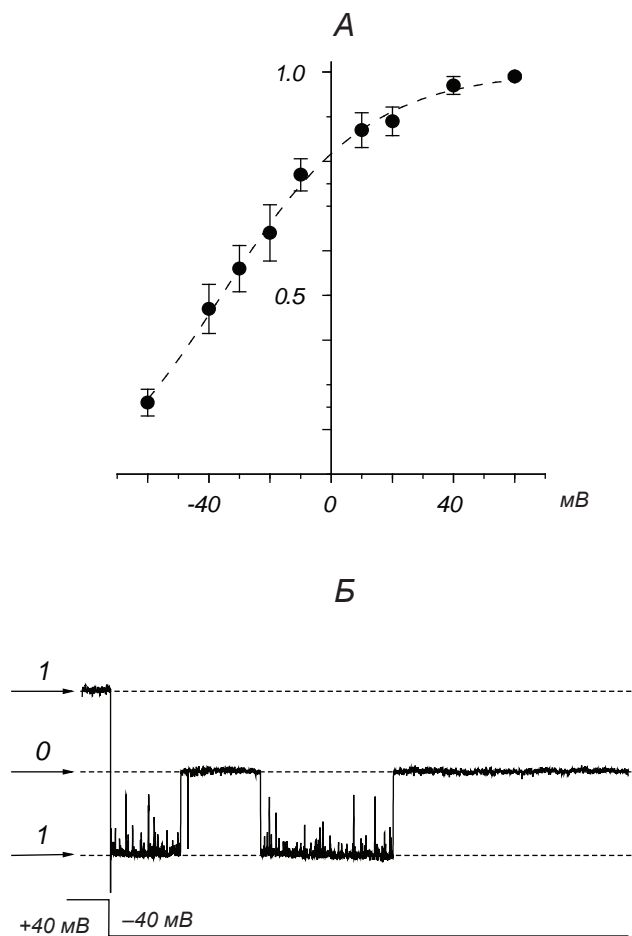
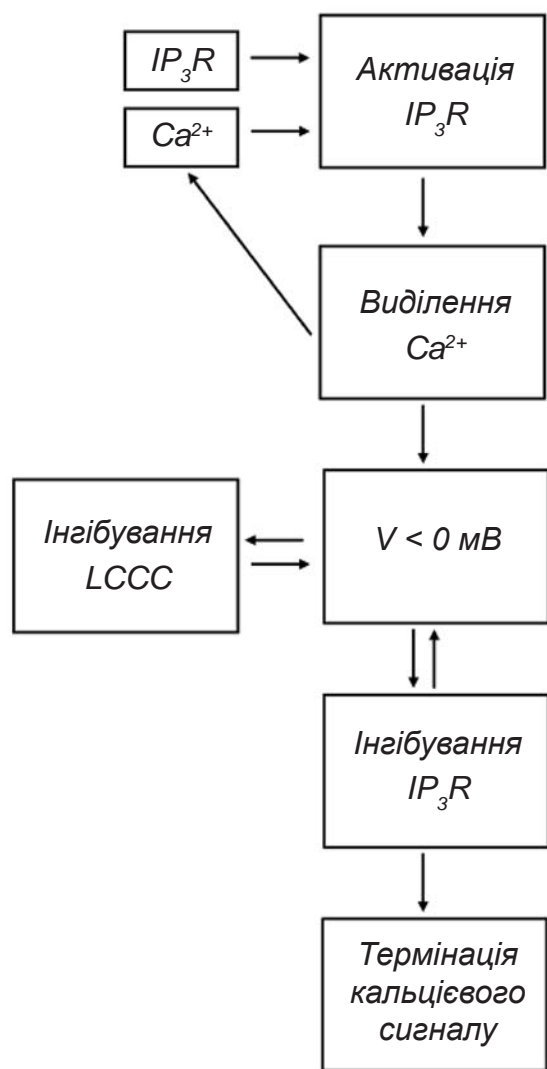


Рис. 5. Залежність вірогідності відкритого стану (P_o) катіонних каналів великої провідності від мембранного потенціалу (мВ, *A*) та блокування цих каналів при потенціалах ≤ -40 мВ (*B*).

провідності, локалізованих поряд з каналами IP_3 -рецепторів, спрямований у протилежний бік щодо струму іонів Ca^{2+} при вивільненні останніх з депо. Цей потік буде перешкоджати різкій негативізації перинуклеарного простору. Таким чином, активація згаданих катіонних каналів мала б збільшувати тривалість кальцієвого сигналу.

Проте, як показали описані вище результати наших досліджень, при значних негативних потенціалах у люмені ядерної оболонки активність катіонних каналів великої провідності різко знижується, і вони зазнають поступового інгібування. Блокування калієвого струму в разі відносно помірних негативних потенціалів має призводити до інтенсивнішого зростання негативного потенціалу в перинуклеарному просторі. При досягненні пев-



Р и с. 6. Схема можливого механізму регуляції тривалості кальцієвих сигналів із залученням каналів інозитолтрифосфатних (IP_3 -) рецепторів (IP_3R) та катіонних каналів великої провідності ($LCCC$) у внутрішній мембрані ядерної оболонки та в мембрані ендоплазматичного ретикулула.

них негативних значень потенціалу на внутрішній мембрані ядерної оболонки починається зниження активності вже IP_3 -рецепторів. Взаємодія згаданих вище процесів має призводити до припинення вивільнення Ca^{2+} з депо і, таким чином, до термінації кальцієвого сигналу. Динаміка такої термінації має залежати від співвідношення динамік процесів потенціалзалежного інгібування/блокування каналів IP_3 -рецепторів і кальцієвих каналів великої провідності, а також конкретних значень тих потенціалів, при яких це інгібування відбувається.

Ендоплазматичний ретикулум (ЕР) є продовженням ядерної оболонки, оскільки зовнішня мембрана останньої та перинуклеарний простір структурно пов'язані з мембраною та луменом ЕР. Усі ці клітинні компартменти мають подібні біохімічні властивості [30, 31]. Як ядерна оболонка, так і ЕР функціонують як найважливіші кальцієві депо [20, 32, 33]. Оскільки ядерна оболонка та ЕР фактично є інтегральним цілим, логічно припустити, що властивості катіонних каналів великої провідності, раніше ідентифіковані в мембранах саркоплазматичному ретикулума – аналога ЕР у м'язових волокнах [34], можуть бути подібними (або навіть ідентичними) до властивостей каналів великої провідності в ядерних мембранах нервових клітин. Крім того, на мембранах ЕР також були виявлені IP_3 -рецептори [33]. Отже, можна припустити, що механізми регуляції вивільнення Ca^{2+} із внутрішньоклітинних депо в клітинах різних типів є аналогічними; запропонований нами механізм термінації кальцієвого сигналу (базований на специфічній потенціалзалежності відповідних каналів) може функціонувати і в ЕР.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. V. Cutsuridis and T. Wennekers, "Hippocampus, microcircuits and associative memory," *Neural Netw.*, **22**, No. 8, 1120-1128 (2009).
2. J. G. Howland and Y. T. Wang, "Synaptic plasticity in learning and memory: stress effects in the hippocampus," *Prog. Brain Res.*, **169**, 145-158 (2008).
3. A. M. Doherty, J. D. Jane, K. Cho, et al., "Neuronal calcium sensors and synaptic plasticity," *Biochem. Soc. Trans.*, **37**, No. 6, 1359-1363 (2009).
4. W. A. Catterall and A. P. Few, "Calcium channel regulation and presynaptic plasticity," *Neuron*, **59**, No. 6, 882-901 (2008).
5. M. Costa-Mattioli, D. Gobert, H. Harding, et al., "Translational control of hippocampal synaptic plasticity and memory by the eIF2alpha kinase GCN2," *Nature*, **436** (7054), No. 25, 1166-1173 (2005).
6. D. J. Linden, "A protein synthesis-dependent late phase of cerebellar long-term depression," *Neuron*, **17**, 483-490 (1996).
7. S. Chawla, "Regulation of gene expression by Ca^{2+} signals in neuronal cells," *Eur. J. Pharmacol.*, **447**, Nos. 2/3, 131-140 (2002).
8. S. A. Josselyn and P. V. Nguyen, "CREB, synapses and memory disorders: past progress and future challenges," *Current Drug Targets. CNS Neurol. Disord.*, **4**, No. 5, 481-497 (2005).
9. G. E. Hardingham, F. J. Arnold, and H. Bading, "Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity," *Nat. Neurosci.*, **4**, No. 3, 261-267 (2001).
10. H. Bading, "Transcription-dependent neuronal plasticity the

- nuclear calcium hypothesis,” *Eur. J. Biochem.*, **267**, No. 17, 5280-5283 (2000).
11. K. Limback-Stokin, E. Korzus, R. Nagaoka-Yasuda, et al., “Nuclear calcium/calmodulin regulates memory consolidation,” *J. Neurosci.*, **24**, No. 1, 10858-10867 (2004).
 12. О. А. Федоренко, Д. Є. Дужий, С. М. Марченко, “Кальцієві канали в ядерній оболонці пірамідних нейронів гіпокампа”, *Нейрофізіологія/Neurophysiology*, **40**, № 4, 228-292 (2008).
 13. G. Guihard, S. Proteau, M. D. Payet, et al., “Patch-clamp study of liver nuclear ionic channels reconstituted into giant proteoliposomes,” *FEBS Lett.*, **476**, 234-241 (2000).
 14. E. Rousseau, C. Michaud, D. Lefebvre, et al., “Reconstitution of ionic channels from inner and outer membranes of mammalian cardiac nuclei,” *Biophys. J.*, **70**, No. 2, 703-714 (1996).
 15. О. А. Федоренко, Д. Є. Дужий, С. М. Марченко, “Спонтанно активні іонні канали мембран ядерної оболонки пірамідних нейронів гіпокампа”, *Нейрофізіологія/Neurophysiology*, **39**, № 1, 3-8 (2007).
 16. M. Mazzanti, L. J. DeFelice, J. Cohn, and H. Malter, “Ion channels in the nuclear envelope,” *Nature*, **22**, No. 343(6260), 764-767 (1990).
 17. E. Rousseau, C. Michaud, D. Lefebvre, et al., “Reconstitution of ionic channels from inner and outer membranes of mammalian cardiac nuclei,” *Biophys. J.*, **70**, No. 2, 703-714 (1996).
 18. A. Draguhn, G. Borner, R. Beckmann, et al., “Large-conductance cation channels in the envelope of nuclei from rat cerebral cortex,” *J. Membrane Biol.*, **158**, No. 2, 159-166 (1997).
 19. A. Franco-Obergon, H. Wang, and D. E. Clapham, “Distinct ion channel classes are expressed on the outer nuclear envelope of T- and B-lymphocyte cell lines,” *Biophys. J.*, **79**, 202-214 (2000).
 20. S. M. Marchenko, V. V. Yarotsky, T. N. Kovalenko, et al., “Spontaneously active and InsP₃-activated ion channels in cell nuclei from rat cerebellar Purkinje and granule neurons,” *J. Physiol.*, **565**, No. 15, 897-910 (2005).
 21. I. Bezprozvanny, “The inositol 1,4,5-trisphosphate receptors,” *Cell Calcium*, **38**, 261-272 (2005).
 22. 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).
 23. О. А. Федоренко, Д. Є. Дужий, С. М. Марченко, “Потенціалзалежність активності інізитолтрифосфатних рецепторів ядерної оболонки пірамідних нейронів гіпокампа”, *Нейрофізіологія/Neurophysiology*, **41**, № 5/6, 363-367 (2009).
 24. O. V. Gerasimenko, J. V. Gerasimenko, A. V. Tepikin, et al., “ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca²⁺ from the nuclear envelope,” *Cell*, **80**, No. 3, 439-444 (1995).
 25. M. Iino, “Molecular basis of spatio-temporal dynamics in inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated Ca²⁺ signalling,” *Jpn. J. Pharmacol.*, **82**, No. 1, 15-20 (2000).
 26. M. D. Bootman, P. Lipp, and M. J. Berridge, “The organization and functions of local Ca²⁺ signals,” *J. Cell Sci.*, **114**, 2213-2222 (2001).
 27. M. J. Berridge, “Elementary and global aspects of calcium signaling,” *J. Exp. Biol.*, **200**, 315-319 (1997).
 28. M. Yamashita, M. Sugioka, and Y. Ogawa, “Voltage- and Ca²⁺-activated potassium channels in Ca²⁺ store control Ca²⁺ release,” *FEBS J.*, **273**, 3585-3597 (2006).
 29. M. Yamashita, “‘Quantal’ Ca²⁺ release reassessed – a clue to oscillation and synchronization,” *FEBS Lett.*, **580**, 4979-4983 (2006).
 30. O. Baumann and B. Walz, “Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains,” *Int. Rev. Cytol.*, **205**, 149-214 (2001).
 31. M. J. Berridge, “The endoplasmic reticulum: a multifunctional signal organelle,” *Cell Calcium*, **32**, Nos. 5/6, 235-249 (2002).
 32. M. F. Leite, E. C. Thrower, W. Echivarria, et al., “Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, No. 5, 2975-2980 (2003).
 33. P. Nicotera, S. Orrenius, T. Nilsson, et al., “An inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca²⁺ pool in liver nuclei,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, No. 17, 6858-6862 (1990).
 34. L. Picard, K. Cote, J. Teijeira, et al., “Sarcoplasmic reticulum K⁺ channels from human and sheep atrial cells display a specific electro-pharmacological profile,” *J. Mol. Cell Cardiol.*, **34**, 1163-1172 (2002).