

ПОТЕНЦІАЛЗАЛЕЖНІСТЬ АКТИВНОСТІ ІНОЗИТОЛТРИФОСФАТНИХ РЕЦЕПТОРІВ ЯДЕРНОЇ ОБОЛОНКИ ПІРАМІДНИХ НЕЙРОНІВ ГІПОКАМПА

Надійшла 01.09.09

У своїх попередніх дослідженнях ми продемонстрували наявність інозитолтрифосфатних рецепторів у внутрішній мембрані ядерної оболонки пірамідних нейронів ділянки *CA1* гіпокампа щурів. У даній роботі ми провели більш детальний аналіз кінетичних властивостей каналів цих рецепторів, який показав залежність вірогідності їх відкритого стану (P_o) від потенціалу всередині люмену ядерної оболонки. При позитивних потенціалах активність каналів зазначеного типу була значно інтенсивнішою, ніж при негативних. У разі позитивних значень потенціалу P_o каналів інозитолтрифосфатних рецепторів підвищувалася за рахунок збільшення як частоти їх спрацьовування, так і тривалості відкритого стану. Ми вважаємо, що потенціалзалежність активності інозитолтрифосфатних рецепторів у внутрішній ядерній мембрані є істотним фактором регуляції кальцієвих сигналів в ядрі, і це впливає на функціонування пірамідних клітин гіпокампа.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ядерна оболонка, пірамідні нейрони гіпокампа, інозитолтрифосфатні рецептори, потенціалзалежність.

ВСТУП

Інозитолтрифосфатні рецептори (IP_3R) – це родина кальційвивільнюючих рецептор-каналних комплексів, котрі розташовані в мембранах внутрішньоклітинних кальцієвих депо. Дані рецептори відіграють істотну роль у регуляції кальцієвої сигналізації в клітинах усіх типів [1–3]. Вони необхідні для вивільнення Ca^{2+} із клітинних депо у відповідь на підвищення концентрації інозитолтрифосфату в результаті дії різноманітних стимулів [4]. Активація IP_3R призводить до генерації локальних (так звані бліпи або пафи) або глобальних (кальцієві хвилі) кальцієвих сигналів [5, 6], які регулюють численні клітинні фізіологічні процеси, включаючи генну транскрипцію [7–9], регуляцію клітинного циклу [10–12], запуск механізмів апоптозу [13–16], синаптичну пластичність [17, 18] тощо.

Порушення IP_3R -опосередкованої кальцієвої сигналізації спостерігаються при хворобах Альцгеймера [19] і Хантінгтона [20]. У разі апоптотичних змін білки IP_3R1 “розрізаються” каспазою-3, що

призводить до IP_3 -незалежного вивільнення Ca^{2+} з кальцієвих депо [16]. Щури з нокаутом гена IP_3R1 є маложиттєздатними; якщо такі тварини і виживають, то страждають на серйозні неврологічні розлади [20]. Очевидно, що вивчення функціональних властивостей IP_3R є дуже актуальним та перспективним напрямком досліджень.

В експериментах з вивчення IP_3R були використані різноманітні підходи. Вже відомі молекулярна будова протеїну даних рецепторів [1, 20] та механізми активації таких рецепторів їх агоністами, іонами Ca^{2+} та інозитолтрифосфатом [21, 22]. Були з’ясовані впливи ендогенних модуляторів на IP_3R [23] тощо. Проте багато аспектів структури та функції згаданих рецепторів ще потребують детального дослідження.

У своїй попередній роботі ми показали, що IP_3R наявні у внутрішніх мембранах ядер пірамідних нейронів ділянки *CA1* гіпокампа щурів [24]. У значених електрофізіологічних дослідженнях ми використовували ізольовані ядра нейронів цього типу. Подібний підхід дозволяє вивчати властивості IP_3R в їх нативному оточенні та є більш адекватним, ніж використання протеоліпосом [25] чи плазмичних ліпідних бішарів [23, 26, 27] із вбудованими в них ділянками ядерних мембран.

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

² Університет ім. Жюльє Верна, Ам'єн (Франція).

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

З урахуванням отриманої інформації ми спрямували свої зусилля на детальніше вивчення біофізичних властивостей IP_3R ядерних мембран нейронів ділянки *CA1* гіпокампа; зокрема, ми звернули увагу на залежність активності каналів IP_3R від змін потенціалу на мембрані.

МЕТОДИКА

Отримання доступу до внутрішньої мембрани ізольованих ядер пірамідних нейронів гіпокампа. Всі експериментальні процедури проводилися відповідно до біоетичних норм законодавства України. Ізольовані ядра пірамідних нейронів ділянки *CA1* гіпокампа отримували так само, як описано в наших попередніх роботах [24, 28]. З великих півкуль головного мозку самців щурів ліній Вістар та Фішер віком два-три тижні швидко виділяли гіпокамп та нарізали його на тонкі зрізи завтовшки до 400 мкм. Отримані зрізи поміщали в базовий розчин, що вміщував (у мілімолях на 1 л): глюконат калію – 150, NEPES – 2.5, NEPES-K – 2.5 (pH 7.3). До розчину додавали “коктейль” протеїнових інгібіторів (“Roche Diagnostics”, Велика Британія) у концентраціях, зазначених виробником. Шар, в якому знаходилися тіла пірамідних нейронів гіпокампа, обережно відокремлювали під біноклюром з використанням мікрохірургічної техніки.

Ізольовані ядра отримували після гомогенізації (пропускання через металеву голку діаметром 0.64 мм) та інкубації протягом 20–30 хв у 1 %-вому розчині цитрату натрію з повільним перемішуванням. Оброблені цитратом ядра втрачали свою зовнішню мембрану [29]; таким чином, внутрішня мембрана ставала досяжною для петч-піпетки. Отриманий гомогенат розміщували в робочій камері під інвертованим мікроскопом. Після відмивання залишків ушкоджених органел базовим розчином ядра ставали придатними для петч-клемп-відведень.

Реєстрація активності інозитолтрифосфатних рецепторів. 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. Досліди 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 Бессела (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 петч-піпетки; потенціал розчину в робочій камері приймали за 0 мВ.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

З літературних джерел відомо, що IP_3 -індуковані сигнали складаються з елементарних подій: так званих бліпів (blip) у тих випадках, коли спрацьовує один IP_3R , або пафів (puff) при одночасному відкритті групи близько розташованих IP_3R [5, 6]. Механізми активації IP_3 -рецепторів їх агоністами (IP_3 та Ca^{2+}) досліджені добре, проте механізми термінації відповідних кальцієвих сигналів залишаються не до кінця з’ясованими. Є декілька гіпотез щодо припинення процесу вивільнення Ca^{2+} із внутрішньоклітинних депо. По-перше, блокування руху іонів Ca^{2+} може відбуватися внаслідок зменшення електрохімічного градієнта щодо Ca^{2+} за рахунок спустошення кальцієвого депо. По-друге, в опублікованих роботах наявні припущення, що інгібування IP_3R відбувається через підвищення концентрації Ca^{2+} біля зовнішньої частини рецептора; там, як вважають, знаходиться його інгібуючий центр [1]. Не відкидаючи можливості того, що ці явища дійсно є факторами, істотно впливаючими на регуляцію кальцієвого сигналу, ми пропонуємо ще один можливий механізм термінації вивільнення Ca^{2+} .

Результати детального дослідження біофізичних властивостей IP_3R у внутрішній мембрані ядер пірамідних нейронів гіпокампа показали, що активність каналів зазначених рецепторів у значній мірі залежить від мембранного потенціалу (рис. 1).

Вірогідність відкритого стану (P_o) IP_3R при позитивних потенціалах на мембрані була набагато вищою, ніж при негативних (рис. 2). Апроксимація залежності P_o від потенціалу виконувалася згідно з рівнянням Больцмана; ефективний заряд для IP_3R нейронів гіпокампа становив 0.75 мВ (рис. 2).

Зміни середнього значення P_o були спричинені змінами як частоти спрацьовувань рецептор-канального комплексу, так і тривалості відкритого стану каналу. Значення часу відкритого стану каналу були помітно більшими в умовах позитивних

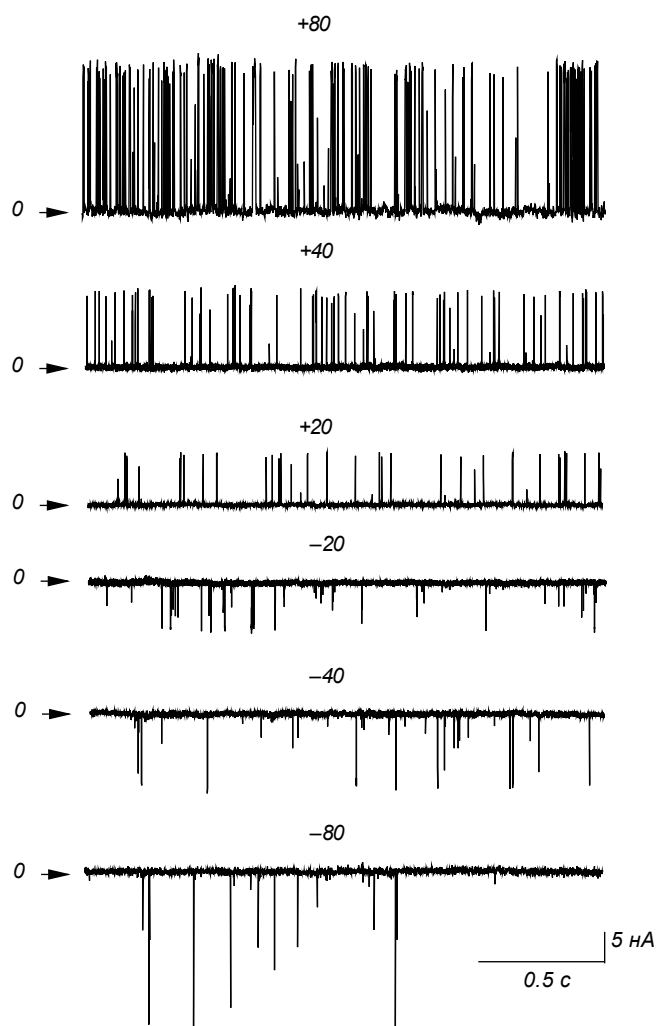


Рис. 1. Струми через канали інозитолтрифосфатних рецепторів, наявних в ядерній мембрані пірамідних нейронів ділянки CA1 гіпокампа щура, при різних потенціалах на мембрані (вказані над записами, мВ).

потенціалів, ніж в умовах негативних (рис. 3). Так, наприклад, при потенціалі на мембрані +20 мВ час відкритого стану поодинокого каналу IP_3R становив у середньому приблизно 1.13 мс, а при потенціалі -20 мВ – лише 0.95 мс, тобто був на 16 % меншим. Отже, цілком логічно припустити, що потенціалзалежне інгібування IP_3 -рецепторів може бути одним з істотних механізмів регуляції тривалості кальцієвих сигналів у ядрі.

Відомо, що вивільнення Ca^{2+} із внутрішньоклітинних депо (наприклад, ядерної оболонки) сполучено з перенесенням великого електричного заряду крізь відповідну мембрану; це спричиняє появу негативного потенціалу в перинуклеарному просторі [30]. Така “негативізація”, зменшуючи тривалість

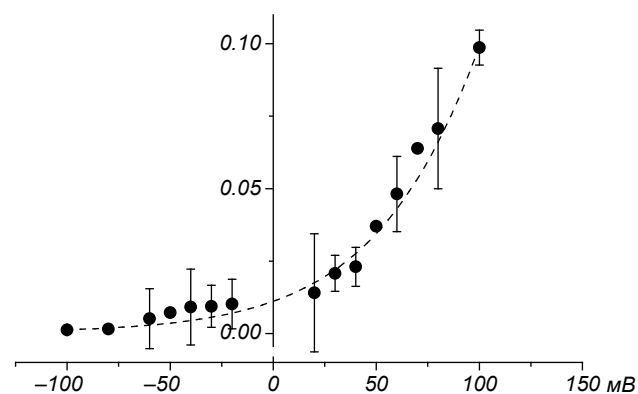


Рис. 2. Залежність вірогідності відкритого стану (P_o) каналів інозитолтрифосфатних рецепторів ядерної оболонки пірамідних нейронів від мембранного потенціалу (мВ).

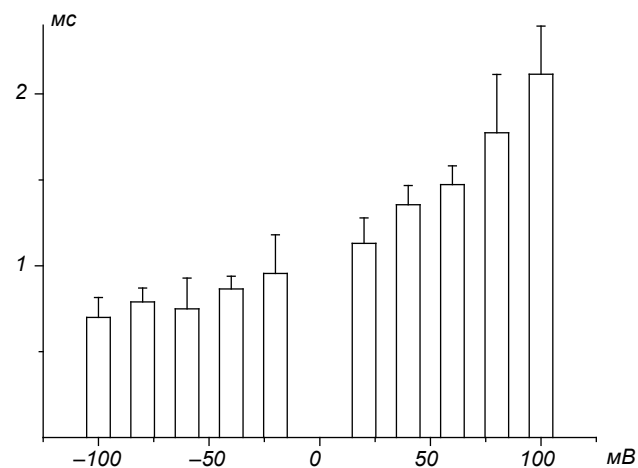


Рис. 3. Залежність середньої тривалості (мс) відкритого стану поодинокого каналу IP_3R ядерної оболонки пірамідних нейронів ділянки CA1 гіпокампа від мембранного потенціалу (мВ).

відкритого стану відповідних каналів та частоту їх спрацьовування, може бути досить важливим фактором, що задіяний у термінацію кальцієвих транз'єнтів у ядрі.

На жаль, поки що відсутні достовірні дані щодо змін потенціалу в люменах внутрішньоклітинних депо під час вивільнення з них Ca^{2+} . Були спроби виміряти такі коливання потенціалу в люмені ядерної оболонки клітин сітківки ембріонів курчат [30, 31]. Результати цих дослідів показали, що коливання потенціалу можуть відбуватись у межах ~45 мВ. Проте адекватність наведених даних викликає певні сумніви, адже у вказаних експериментах не вдалося відокремити мембрани ядерної оболонки від сітки мембран ендоплазматичного ретикулу-

ма. Останній, у свою чергу, є дуже гетерогенною структурою; принаймні, на одних його ділянках можуть знаходитися великі скупчення кальцієвих каналів, тоді як в інших локусах такі канали взагалі можуть бути відсутніми. Згадані дослідники вимірювали середнє значення коливань потенціалу в люмені всього ендоплазматичного ретикулума, а на окремих його ділянках це значення може бути значно більшим. Отже, питання про можливі межі коливання потенціалу в люмені кальцієвих депо на сьогодні залишається відкритим.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. I. Bezprozvanny, "The inositol 1,4,5-trisphosphate receptors," *Cell Calcium*, **38**, 261-272 (2005).
2. C. W. Taylor, A. A. Genazzani, and S. A. Morris, "Expression of inositol trisphosphate receptors," *Cell Calcium*, **26**, No. 6, 237-251 (1999).
3. S. M. Marchenko and R. C. Thomas, "Nuclear Ca^{2+} signalling in cerebellar Purkinje neurons," *Cerebellum*, **5**, No. 1, 36-42 (2006).
4. M. Iino, "Molecular basis of spatio-temporal dynamics in inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated Ca^{2+} signalling," *Jpn. J. Pharmacol.*, **82**, No. 1, 15-20 (2000).
5. M. D. Bootman, P. Lipp, and M. J. Berridge, "The organization and functions of local Ca^{2+} signals," *J. Cell Sci.*, **114**, 2213-2222 (2001).
6. M. J. Berridge, "Elementary and global aspects of calcium signaling," *J. Exp. Biol.*, **200**, 315-319 (1997).
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. M. Whitaker, "Regulation of the cell division cycle by inositol trisphosphate and the calcium signalling pathway," *Adv. Second Messeng. Phosphoprotein Res.*, **30**, 299-310 (1995).
11. S. Kume, "Role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in early embryonic development," *Cell Mol. Life Sci.*, **56**, Nos. 3/4, 296-304 (1999).
12. P. Lenart and J. Ellenberg, "Monitoring the permeability of the nuclear envelope during the cell cycle," *Methods*, **38**, No. 1, 17-24 (2006).
13. D. E. Gutstein and A. R. Marks, "Role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in regulating apoptotic signalling and heart failure," *Hear. Vessels*, **12**, 53-57 (1997).
14. D. Boehning, R. L. Patterson, and L. Sedaghat, "Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis," *Nat. Cell Biol.*, **5**, 1051-1061 (2003).
15. D. Boehning, D. B. van Rossum, R. L. Patterson, et al., "A peptide inhibitor of cytochrome c / inositol 1,4,5- trisphosphate receptor binding blocks intrinsic and extrinsic cell death pathways," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 1466-1471 (2005).
16. Z. Assefa, G. Bultynck, K. Szlufcik, et al., "Caspase-3-induced truncation of type I inositol trisphosphate receptor accelerates apoptotic cell death and induces inositol trisphosphate-independent calcium release during apoptosis," *J. Biol. Chem.*, **279**, 43227-43236 (2004).
17. H. Bading, "Transcription-dependent neuronal plasticity the nuclear calcium hypothesis," *Eur. J. Biochem.*, **267**, No. 17, 5280-5283 (2000).
18. K. Limback-Stokin, E. Korzus, R. Nagaoka-Yasuda, et al., "Nuclear calcium/calmodulin regulates memory consolidation," *J. Neurosci.*, **24**, No. 1, 10858-10867 (2004).
19. F. M. LaFerla, "Calcium dyshomeostasis and intracellular signaling in Alzheimer's disease," *Nat. Rev. Neurosci.*, **3**, 862-872 (2002).
20. I. Bezprozvanny and M. R. Hayden, "Deranged neuronal calcium signaling and Huntington disease," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **322**, 1310-1317 (2004).
21. R. E. Hagar, A. D. Burgstahler, M. H. Nathanson, et al., "Type III $InsP_3$ receptor channel stays open in the presence of increased calcium," *Nature*, **396**, 81-84 (1998).
22. O. V. Gerasimenko, J. V. Gerasimenko, A. V. Tepikin, et al., "ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca^{2+} from the nuclear envelope," *Cell*, **80**, No. 3, 439-444 (1995).
23. R. Hagar and E. Ehrlich, "Regulation of the type III $InsP_3$ receptor by $InsP_3$ and ATP," *Biophys. J.*, **79**, No. 1, 271-278 (2000).
24. O. A. Fedorenko, D. E. Duzhyy, and S. M. Marchenko, "Calcium channels in the nuclear envelope of pyramidal neurons of the hippocampus," *Neurophysiology*, **39**, No. 3, 13-18 (2008).
25. 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).
26. A. J. Minn, P. Velez, S. L. Schendel, et al., "Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes," *Nature*, **23**, No. 385(6614), 353-357 (1997).
27. 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).
28. O. A. Fedorenko, D. E. Duzhyy, and S. M. Marchenko, "Spontaneously active ion channels of membranes of the nuclear envelope of hippocampal pyramidal neurons," *Neurophysiology/Neurofiziologiya*, **39**, No. 1, 3-8 (2007).
29. 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).
30. M. Yamashita, M. Sugioka, and Y. Ogawa, "Voltage- and Ca^{2+} -activated potassium channels in Ca^{2+} store control Ca^{2+} release," *FEBS J.*, **273**, 3585-3597 (2006).
31. M. Yamashita, "Quantal Ca^{2+} release reassessed – a clue to oscillation and synchronization," *FEBS Lett.*, **580**, 4979-4983 (2006).