

ВЛАСТИВОСТІ ІНОЗИТОЛ-1,4,5-ТРИФОСФАТНИХ РЕЦЕПТОРІВ В ЯДРАХ НЕЙРОНІВ ЦНС ЩУРІВ

Надійшла 05.05.14

Ми досліджували властивості інозитол-1,4,5-трифосфатних рецепторів (InsP₃Rs) у мембранах ядерної оболонки нейронів ЦНС щурів. Було виявлено, що в клітинах з найвищим рівнем експресії InsP₃Rs дані рецептори локалізовані переважно на внутрішній ядерній мембрані. Це дає можливість припустити залучення ядерного кальцієвого депо в регуляцію експресії кальційзалежних генів. Аплікації агоністів InsP₃Rs інозитолтрифосфату (InsP₃) та Ca²⁺ у концентраціях, менших за 1.0 мкМ, викликали швидку активацію каналів InsP₃Rs, після чого спостерігалась їх певна стаціонарна активність. Аплікація Ca²⁺ у концентраціях, більших за вищезгадану, істотно не впливала на характеристики пікових відповідей цих рецепторів, проте потім останні майже цілком втрачали чутливість протягом декількох секунд. Отже, кальцієва залежність стабільної активності InsP₃Rs була дзвоноподібною. Пікова ж активність означених рецепторів у разі фізіологічних меж концентрацій внутрішньоклітинного Ca²⁺ не інгібувалась аплікаціями агоністів. Це спостереження вирішує основне протиріччя між даними, які були отримані різними дослідницькими групами раніше. У той же час сутність специфіки кінетичних властивостей InsP₃Rs в умовах різних експериментальних моделей потребує подальших досліджень.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: інозитол-1,4,5-трифосфатні рецептори, ядра нейронів, кальцієва сигналізація.

ВСТУП

Інозитол-1,4,5-трифосфатні рецептори (InsP₃Rs) є основним типом внутрішньоклітинних кальційзвільнюючих каналів, які локалізовані переважно в ендоплазматичному ретикулумі (ER). Незважаючи на численні дослідження, існує значна розбіжність поглядів щодо основних властивостей цих рецепторів [1–5]. Істотні суперечки також стосуються ролі ядерної оболонки в регуляції кальцієвої сигналізації в нервовій клітині [6]. Для вирішення цих проблем ми вивчали InsP₃Rs в ядерній мембрані нейронів гіпокампа та мозочка щурів. Ядерна оболонка, яка переходить у мембрану ER, є єдиною частиною даної внутрішньоклітинної системи, відносно легко доступною для прямих петч-клемп-досліджень.

Було показано, що в нейронах деяких типів рівень експресії InsP₃Rs є дуже високим. При цьому

слід мати на увазі, що нейрони досить різноманітні за своїми властивостями, а кількість нервових клітин складає лише приблизно 10 % загальної кількості всіх клітин мозку. Через відповідну гетерогенність однією з проблем при дослідженні ізольованих ядер нейронів ЦНС є ідентифікація означених об'єктів. Ми розробили методики виділення клітинних ядер із нейронів певних структур ЦНС ссавців [3]. У цій роботі ми повідомляємо деякі останні дані щодо властивостей InsP₃Rs в ядерній оболонці нейронів ЦНС щурів.

МЕТОДИКА

Виділення ядер із нейронів мозкових структур. З мозку щурів-самців лінії Вістар віком три тижні виділяли мозочок та гіпокамп. Виготовляли зрізи тканин мозочка та гіпокампа (нарізка вручну); їх зберігали в пробірках об'ємом 1.5 мл при 0 °С в розчині, що вміщував (у мілімолях на 1 л): калію глюконат – 150, NEPES-КОН – 10 (рН 7.2). До розчину додавали „коктейль” інгібіторів протеїназ

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

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

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

(„Roche Diagnostics”, Велика Британія); концентрації інгібіторів відповідали тим, що були зазначені виробником. Зрізи в пробірках зберігались у холодильнику та могли використовуватися протягом трьох днів. Пірамідний шар ділянок *CA1* та *CA3*, а також гранулярний шар зубчастої звивини в зрізах гіпокампа відокремлювали за допомогою мікхірургічної техніки. Отримані препарати гомогенізували, пропускаючи через сталеву ін’єкційну голку (діаметр 0.6 мм). Гомогенат центрифугували; осад, що вмщував ядра нейронів, ресуспендували в розчині вказаного вище складу та переносили в робочу камеру інвертованого мікроскопа („Leica Microsystems”, ФРН). Після седиментації ядер на скляну поверхню дна робочої камери отримані препарати промивали розчином KCl (KCl – 150 мМ, NERES-KOH – 5 мМ; рН 7.2). Ядра візуалізували за допомогою Pixelfly CCD-камери („Kelheim”, ФРН). Для отримання доступу до внутрішньої ядерної мембрани препарати інкубували у 1 %-вому розчині цитрату натрію протягом 15–20 хв (при обережному помішуванні розчину) [7].

Електрофізіологічні дослідження. Дослідження струмів через поодинокі кальцієві канали InsP_3R проводили з використанням методу петч-клемп у конфігурації „nucleus-attached” або „excised patches” у режимі фіксації потенціалу. Не було помічено жодної різниці в результатах, отриманих у цих двох конфігураціях, тому дані були проаналізовані спільно. Петч-піпетки виготовляли з боросилікатного скла („Sutter Instruments”, США); їх опір варіював від 8 до 12 МОм. Піпетки заповнювали розчином KCl. 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 c^{-1} і зберігали на жорсткому диску комп’ютера. Всі досліди виконували при температурі 18–20 °С. На рисунках дані представлені як середні значення \pm похибка середнього; вказана також кількість спостережень (*n*).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ми вивчали InsP_3Rs в ядерних мембранах клітин Пуркін’є мозочка та пірамідних нейронів ділянок *CA1* і *CA3* гіпокампа шурів. Численні InsP_3 -активовані канали були виявлені у внутрішній ядерній мембрані нейронів Пуркін’є і пірамідних нейронів зони *CA1*. У зовнішній ядерній мембра-

ні нейронів Пуркін’є не було знайдено жодного InsP_3Rs , а в аналогічних мембранах пірамідних нейронів *CA1* таких рецепторів було дуже мало. На відміну від цього, тільки два InsP_3R було виявлено в зовнішній ядерній мембрані пірамідних нейронів зони *CA3*, і жодного InsP_3R не спостерігалось у внутрішній ядерній мембрані таких нервових клітин. Також InsP_3Rs не були ідентифіковані в ядерній мембрані гранулярних нейронів мозочка [3] та зубчастої звивини гіпокампа.

Наведені дані свідчать про те, що, по-перше, експресія InsP_3Rs в ядерній оболонці корелює із загальним рівнем експресії вказаних рецепторів у певних клітинах. По-друге, у нейронах з інтенсивною експресією InsP_3Rs (клітини Пуркін’є та пірамідні нейрони зони *CA1* гіпокампа) зазначені рецептори локалізуються переважно у внутрішній ядерній мембрані. На підставі цього слід припустити активну роль ядерного кальцієвого депо в регуляції ядерної кальцієвої сигналізації в згаданих нейронах [6, 8]. У клітинах з низьким рівнем експресії InsP_3Rs (пірамідні нейрони зони *CA3* гіпокампа, гранулярні клітини мозочка та нейрони зубчастої звивини гіпокампа) роль ядерної оболонки як істотного кальцієвого депо залишається під питанням. Таким чином, механізм регуляції ядерної кальцієвої сигналізації в різних клітинах ЦНС може суттєво розрізнятися.

InsP_3Rs -активовані канали ядерної мембрани різних нейронів мали подібні властивості. Всі вони, мабуть, відносяться до InsP_3Rs типу 1 – основної ізоформи цих рецепторів у нейронах. Вони всі функціонували як малоселективні кальцієві канали з майже аналогічними провідністю (у середньому близько 356 пСм у симетричному розчині KCl) та кінетикою. InsP_3Rs демонстрували чітку потенціалзалежність, інгібуючись за негативних потенціалів у люмені ядерної оболонки. Остання властивість InsP_3Rs дозволяла нам легко визначати їх локалізацію у внутрішній або зовнішній ядерній мембрані. Внутрішня ядерна мембрана також вмщує численні катіонні канали великої провідності. Щільність і локалізація цих каналів тісно корелюють із такими InsP_3Rs .

InsP_3Rs активуються в умовах одночасного зв’язування двох агоністів – InsP_3 і Ca^{2+} . Механізми регулювання рецепторів кальцієм викликають багато суперечок. Раніше повідомлялося, що в стаціонарних умовах і при насичуючій концентрації InsP_3 згадані рецептори, отримані з клітин мозочка та інкорпоровані в штучні ліпідні бішари, активу-

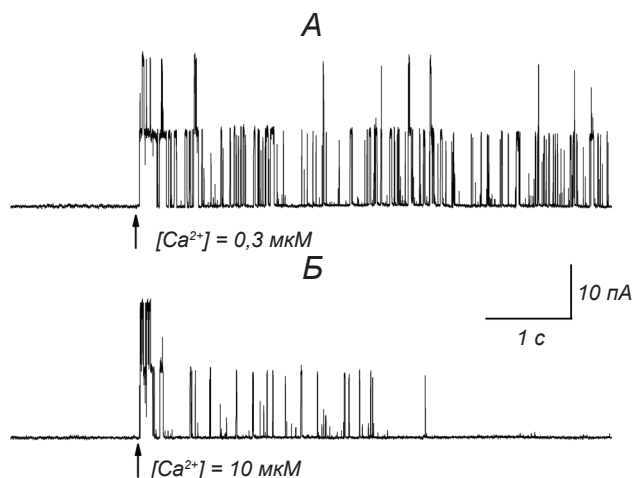
ються іонами Ca^{2+} у низьких концентраціях та інгібуються в разі підвищення концентрації цих іонів [1]. На відміну від згаданих результатів, під час дослідження InsP_3Rs зовнішньої ядерної мембрани ооцитів *Xenopus* виявилось, що Ca^{2+} у фізіологічному діапазоні внутрішньоклітинних концентрацій не пригнічував активності даних рецепторів у разі $[\text{InsP}_3] > 33 \text{ нМ}$ [4]. Причина цього протиріччя була незрозумілою.

У внутрішній ядерній мембрані агоніст-зв'язуючий локус InsP_3Rs спрямований у бік нуклеоплазми (або, відповідно, розчину у робочій камері при конфігурації „excised patches”). Це дозволяє використовувати метод концентраційного клемпу („concentration-clamp technique”) для дослідження нестационарної кінетики InsP_3 -активованих каналів у внутрішній ядерній мембрані.

Швидка ($< 1 \text{ мс}$) аплікація Ca^{2+} у присутності InsP_3 у насичуючих концентраціях (2–10 мкМ) викликала швидку активацію InsP_3Rs (рис. 1). Коли ж концентрація Ca^{2+} була нижчою за 1 мкМ, початковий „сплеск” активності каналів супроводжувався помірною стаціонарною активацією останніх (рис. 1, А). Імовірність відкритого стану (P_o) каналу на початку запису була вищою, ніж у стаціонарній фазі відповіді. Так, наприклад, коли концентрація Ca^{2+} дорівнювала 0.3 мкМ, середня P_o InsP_3Rs протягом перших 100 мс після аплікації агоніста становила 0.49 ± 0.07 , але після 4 с значення цього параметра знижувалося до 0.02 ± 0.01 (рис. 2, А). При концентрації Ca^{2+} , вищій за 1 мкМ, InsP_3Rs повністю десенситизувалися протягом декількох се-

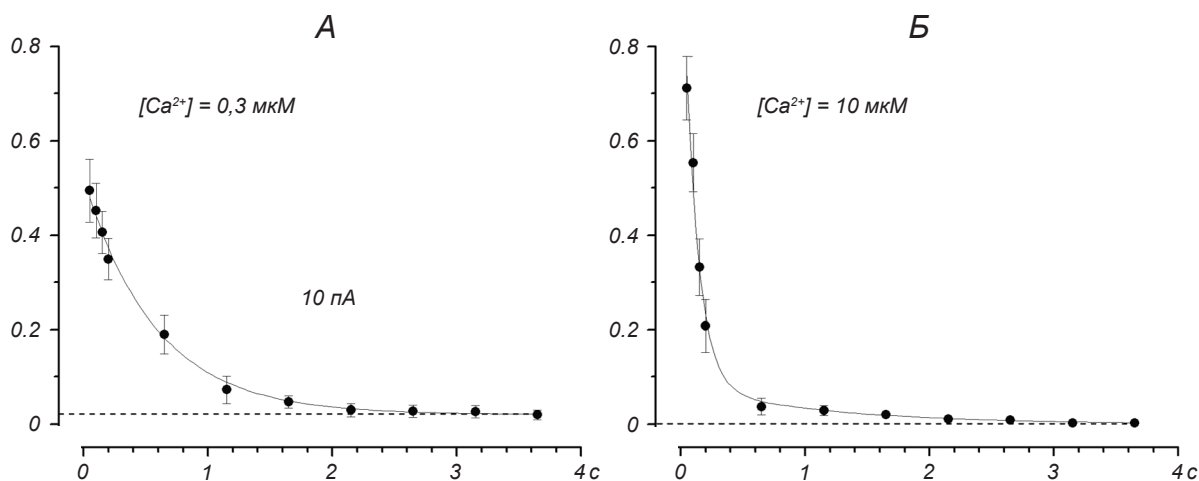
кунд після аплікації агоністів, але початковий пік їх активності був досить високим (рис. 1, Б; 2, Б). Тому дозозалежність стаціонарної активності InsP_3 -активованих каналів має дзвоноподібну форму. В той же час пікова активність згаданих каналів не гальмувалася в умовах високих (до 50 мкМ) концентрацій Ca^{2+} .

Ці дані дозволяють пояснити суперечності між гіпотезами щодо регулювання InsP_3Rs у разі змін концентрацій Ca^{2+} – «дзвоноподібною» [1] та



Р и с. 1. Активність інозитол-1,4,5-трифосфатних рецепторів (InsP_3Rs) у внутрішній ядерній мембрані нейронів Пуркін’є мозочка.

Канали активувалися швидко ($< 1 \text{ мс}$) аплікацією розчинів, що вміщували 0.3 (А) або 10 (Б) мкМ Ca^{2+} та 10 мкМ інозитолтрифосфату. Пік активності InsP_3Rs істотно не блокувався після аплікації Ca^{2+} у високих концентраціях, проте аплікація Ca^{2+} у концентрації $\geq 1 \text{ мкМ}$ призводила до наступної повної десенситизації каналів, залежної від часу.



Р и с. 2. Залежність активності інозитол-1,4,5-трифосфатних рецепторів від часу та концентрації Ca^{2+} . Підвищення концентрації Ca^{2+} зумовлювало збільшення піку активності, але при концентраціях $> 0.2 \text{ мкМ}$ стаціонарна P_o активованих інозитолтрифосфатазою каналів зменшувалась. При більш високих концентраціях Ca^{2+} кінетика десенситизації InsP_3Rs прискорювалась.

гіпотезою «настройки лігандом» [4]. В експериментах групи Фоскета агоністи аплікувалися до InsP_3Rs через петч-піпетку після формування гігаомного контакту із зовнішньою ядерною мембраною ооцитів *Xenopus*. Було повідомлено, що InsP_3Rs необоротно десенсибілізувалися після короткого періоду активності. Дане явище в наших експериментах не спостерігалось; слід вважати, що воно не є властивістю, притаманною InsP_3Rs *in situ*. У згаданих вище експериментах не було представлено записів стаціонарної активності каналів; отже, виявлена Маком та його співавт. кальцієва залежність відноситься до транзйентної активності після застосування агоністів. Це узгоджується з нашими спостереженнями, згідно з якими Ca^{2+} при концентраціях, вищих за 1 мкМ, не пригнічував пікової активності каналів. Водночас InsP_3Rs демонстрували залежну від часу десенсибілізацію.

Рівень десенсибілізації зростає зі збільшеннями концентрації Ca^{2+} , що при перевищенні значення 1 мкМ призводило до повного блокування InsP_3Rs (рис. 1, Б; 2, Б). Це відповідає дзвоноподібній формі кальцієвої залежності стаціонарної активності InsP_3Rs . Взаємодія впливів Ca^{2+} та десенсибілізації InsP_3Rs може бути основним механізмом формування транзйентних кальцієвих сигналів, таких як кальцієві «пафи», спайки та осциляції.

Робота виконана при підтримці Державної ключової лабораторії молекулярної та клітинної біології НАН України (грант ДФФД F 46.2/001).

Дослідження були проведені згідно з положеннями Міжнародної конвенції щодо захисту тварин, які використовуються в експериментах (Страсбург, 1985), а також по-

ложеннями Комітету з біоетики Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

Автори даної роботи – О. А. Федоренко та С. М. Марченко – підтверджують відсутність у них конфлікту інтересів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. I. Bezprozvanny, J. Watras, and B. E. Ehrlich, "Bell-shaped calcium-response curves of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ and calcium gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum," *Nature*, **351**, 751-754 (1991).
2. 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).
3. 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).
4. D. O. D. Mak, S. McBride, and J. K. Foskett, "Inositol 1,4,5-trisphosphate activation of inositol tris-phosphate receptor Ca^{2+} channel by ligand tuning of Ca^{2+} inhibition," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 15821-15825 (1998).
5. 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).
6. S. M. Marchenko and R. C. Thomas, "Nuclear Ca^{2+} signalling in cerebellar Purkinje neurons," *Cerebellum*, **5**, 36-42 (2006).
7. 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).
8. S.-J. Zhang, M. Zou, L. Lu, et al., "Nuclear calcium signaling controls expression of a large gene pool: identification of a gene program for acquired neuroprotection induced by synaptic activity," *PLoS Gen.*, **5**, No. 8, e1000604 (2009).