

О.А. Федоренко, Д.Є.Дужий, С.М. Марченко

## Ядерні іонні канали гранулярних нейронів зубчастої звивини

*В данной работе мы описали биофизические свойства ионных каналов на мембранах ядер нейронов зубчатой извилины гиппокампа. На внешней ядерной мембране был зарегистрирован анионный (329 пСм), а на внутренней катионный (179 пСм) и анионный (157 пСм) каналы. Ионные каналы ядерных мембран нейронов зубчатой извилины резко отличаются от каналов в ядрах нейронов мозжечка и СА1 области гиппокампа, что подтверждает наше предположение об экспрессии разных наборов ионных каналов на мембранах ядер клеток различных типов. Физиологическое значение каналов ядер нейронов зубчатой извилины остается невыясненным. Вероятно, они необходимы для поддержания ионного баланса между цитоплазмой и люменом ядерной оболочки и, возможно, эндоплазматического ретикулула клетки.*

### ВСТУП

В еукаріотних клітинах генетичний апарат обмежений ядерною оболонкою, що складається з двох окремих (зовнішньої та внутрішньої) ядерних мембран, між якими знаходиться перинуклеарний простір. Ядерна оболонка може брати активну участь у регуляції транспорту між цитоплазмою та нуклеоплазмою, і таким чином регулювати активність генетичного апарату клітини. Зовнішня ядерна мембрана і перинуклеарний простір морфологічно сполучені з ендоплазматичним ретикуломом (ЕР), тому ядерну оболонку можна розглядати як його специфічну частину.

Електрофізіологічні властивості ядерної оболонки почали досліджувати ще у 60-ті роки, проте вперше зареєструвати поодинокі іонні канали вдалося значно пізніше [16]. Виявилось, що крім ядерних пор, які відповідають за ядерно-цитоплазматичний транспорт, на зовнішній мембрані ядерної оболонки є іонні канали, котрі сполучають цитоплазму з перинуклеарним простором. Останнім часом з'явилася низка робіт, які підтверджують існування ядерних іонних

каналів у багатьох типах клітин [1, 2, 4, 5, 7, 9, 13, 18, 20].

Для досліджень властивостей поодиноких іонних каналів ядерних мембран використовують ізольовані ядра [3, 5, 13], а також протеоліпосоми [9] чи плоскі біліпідні шари [17, 19] із вбудованими в них ядерними мембранами. За допомогою певних методичних підходів можна окремо досліджувати внутрішню чи зовнішню ядерні мембрани та їх іонні канали [13, 15, 19].

Під час реєстрації поодиноких каналів у внутрішньоклітинних мембранах було виявлено декілька типів іонних каналів з різними біофізичними властивостями. Досить суперечливим залишається питання щодо функції іонних каналів ядерної оболонки. Вважають, що вони відповідають за підтримання сталої концентрації різних іонів у перинуклеарному просторі. Крім того, припускають, що деякі канали можуть брати участь у функціонуванні ядерної оболонки як кальцієвого депо [1, 6, 8, 13, 14]. Але через свою важкодоступність для прямих експериментів ці канали залишаються малодослідженими.

© О.А. Федоренко, Д.Є.Дужий, С.М. Марченко

Нами були досліджені іонні канали ядерних мембран нейронів мозочка та пірамідних нейронів ділянки CA1 гіпокампа [1, 6]. Також ми показали, що на ядерних мембранах різних нейронів мозочка експресуються відмінні групи іонних каналів [13]. Тому виникає питання чи відрізняються набори іонних каналів ядер різних нейронів гіпокампа, адже він є досить гетерогенним органом, окремі відділи якого відповідають за свої певні функції.

Метою цієї роботи було дослідження біофізичних властивостей іонних каналів мембран ядерної оболонки гранулярних нейронів зубчастої звивини гіпокампа.

## МЕТОДИКА

Отримання ізольованих ядер нейронів гіпокампа. Дослідження проводили на щурасамцях лінії Вістар або Фішер віком 2–3 тиж. Після декапітації щурів виділяли великі півкулі їх головного мозку, які клали у посуд з охолодженням (1–4°C) розчином, що містив (ммоль/л): NaCl – 120, KCl – 2,5, MgSO<sub>4</sub> – 1,3, CaCl<sub>2</sub> – 1, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,3, NaHCO<sub>3</sub> – 26, глюкоза – 10; рН 7,3.

З однієї півкулі швидко виділяли гіпокамп і робили зрізи завтовшки до 400 мкм, які поміщали у розчин, що містив (ммоль/л): глюконат калію – 150, NEPES – 2,5, NEPES-K – 2,5; рН 7,3. До цього розчину додавали суміш протейнових ігнібіторів (“Roche Diagnostics”, Велика Британія) у концентраціях, зазначених виробником.

За допомогою мікрохірургічної техніки із зрізів виділяли шар, в якому розташовані соми гранулярних нейронів. Після цього зразки тканини були гомогенізовані за допомогою пропускання через голку розміром 0,64 мм.

Отриманий гомогенат розміщували в робочій камері під інвертованим мікроскопом Leica DMIRB (“Leica Microsystems”, Німеччина). Через деякий час ядра осідали та щільно прикріплювалися до дна цієї камери, після чого залишки інших органел та ушкоджені ядра відмивали розчином, що містив (ммоль/л): KCl – 150; NEPES –

2,5; NEPES-K – 2,5; рН 7,3. В результаті описаних операцій ядра ставали придатними для patch-clamp-відведень від зовнішньої мембрани.

Отримання зразків для реєстрації від внутрішньої мембрани проводили як описано раніше [6, 13]. Ядра інкубували в 1%-му розчині цитрату натрію з додаванням 5 ммоль/л діетилтритола протягом 20–30 хв, повільно перемішуючи. Це призводить до усування зовнішньої ядерної оболонки, не пошкоджуючи внутрішню [10]. Подальші процедури проходили так само, як і для дослідів із зовнішньою мембраною.

Електрофізіологічні дослідження. Реєстрацію поодиноких іонних каналів проводили з використанням методу patch-clamp на цілому ядрі (конфігурація “nucleus-attached”) або ізольованій частині мембрани (“excised patches”) у режимі фіксації потенціалу. Досліди проводили при 18–20°C. Patch-піпетки були виготовлені з боросилікатного скла (“Sutter Instruments”, США). Їх опір варіював від 5 до 12 МОм. Індиферентний електрод Ag-AgCl був сполучений з робочою камерою через агаровий місток. Ванночку заповнювали стандартним розчином 150 ммоль KCl, проте він міг замінюватися.

Результати реєстрували за допомогою підсилювача VP-500 (“Bio-Logic”, Франція). Дані фільтрували низькочастотним фільтром Бесселя (2 кГц), оцифровували з частотою 10 кГц та зберігали на жорсткому диску комп’ютера. Отримані результати були проаналізовані за допомогою програми pClamp 9.0 (“Axon Instruments”, США). У всіх випадках вказувався електричний потенціал піпетки, а потенціал розчину в робочій камері приймався за 0 мВ.

## РЕЗУЛЬТАТИ

При дослідженні поодиноких іонних каналів від мембран ядерної оболонки нейронів зубчастої звивини гіпокампа було виявлено декілька їх типів з різними біофізичними властивостями.

На зовнішній ядерній мембрані ми реєстрували іонний канал з високою провід-

ністю, середнє значення якої у розчині 150 ммоль/л KCl становило  $329 \text{ пСм} \pm 16 \text{ пСм}$  ( $n=5$ ) (рис.1). У канала був досить повільний характер роботи (див. рис.1) без чіткої потенціалзалежності.

Для визначення іонної селективності цього каналу стандартний розчин у піпетці змінили на розчин тріс-Cl (ммоль/л): тріс (гідроксиметил)амінометан – 160, HCl – 110. За таких умов на всіх потенціалах у діапазоні від +40 до -80 мВ ми спостерігали як вхідний, так і вихідний струми (див. рис.1). Це свідчить про те, що досліджуваний канал був селективний для іонів хлору і практично непроникний для  $K^+$ .

На внутрішній ядерній мембрані було виявлено канали двох типів. Вони мали

майже однакову провідність, проте різко відрізнялися за характером своєї роботи. Перший тип каналів у розчині 150 ммоль/л KCl мав провідність  $179 \text{ пСм} \pm 15 \text{ пСм}$  ( $n=6$ ) (рис.2). Характер роботи каналу був досить повільним та залежав від потенціалу мембрани. На позитивних потенціалах канал майже весь час був відкритий та сильно флюктуював, а на негативних потенціалах його активність зменшувалася (рис.2).

Для того, щоб визначити селективність цього каналу, ми замінили стандартний розчин KCl у робочій камері на еквімолярний розчин глюконату калію. В цих умовах спостерігали як вхідні, так і вихідні струми, що свідчить про непроникність цього каналу для іонів  $Cl^-$ . Потім розчин у

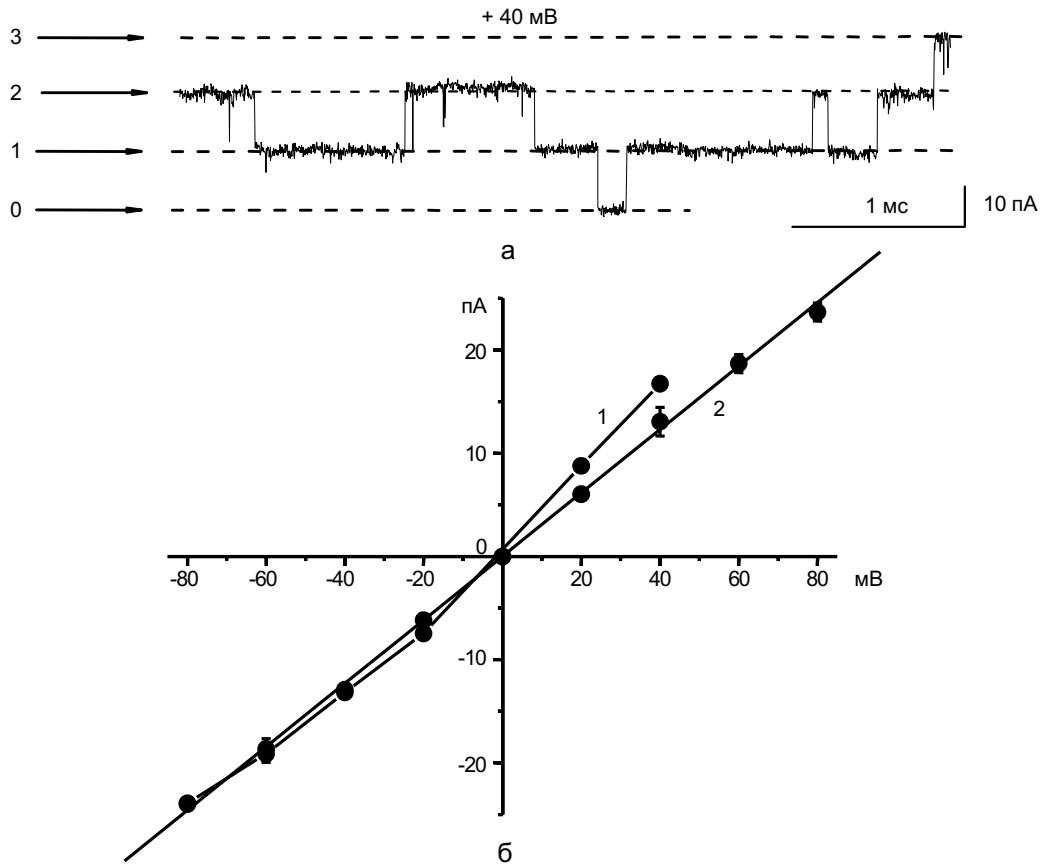


Рис.1. Іонний канал зовнішньої ядерної мембрани: а – запис хлорного каналу, який був зареєстрований на зовнішній мембрані ядер нейронів зубчастої звивини. Стрілками вказана кількість відкритих каналів; б – вольт-амперна характеристика цього каналу: 1 – реєстрації у симетричному розчині 150 ммоль/л KCl, 2 – реєстрації зі стандартним розчином у піпетці та розчином тріс-Cl у робочій камері

піпетці замінили на тріс-Cl, внаслідок чого на всіх потенціалах у діапазоні від +80 до -80 мВ реєстрували виключно вхідний струм (див. рис.2). Отримані результати підтверджують те, що цей канал був селективний до катіонів.

Другий тип каналів демонстрував інший характер роботи. Канали часто та швидко флюктували між двома рівнями провідності (рис.3). Значення максимального рівня провідності у розчині 150 ммоль/л було  $157 \text{ пСм} \pm 9 \text{ пСм}$  ( $n=5$ ). Другий рівень провідності становив  $84 \text{ пСм} \pm 8 \text{ пСм}$  ( $n=5$ ) (рис.3), що дорівнює приблизно половині значення максимального рівня.

Для визначення селективності цього

каналу внутрішньопіпетковий розчин замінили на еквімолярний розчин глюконату калію. У робочій камері залишився стандартний розчин 150 ммоль/л KCl. За таких умов на всіх потенціалах у діапазоні від -60 мВ до +60 мВ спостерігався виключно вхідний струм (див.рис.3), що свідчить про селективність цього каналу до іонів хлору.

Ми намагалися зареєструвати ріанодинові чи інозитолтрифосфатні рецептори на зовнішній і внутрішній мембранах ядерної оболонки гранулярних нейронів. Для цього в піпетку та робочу камеру додавали розчин, який містив (ммоль/л): KCl – 150, HEPES – 5, HEPES-K – 5, інозитолтрифос-

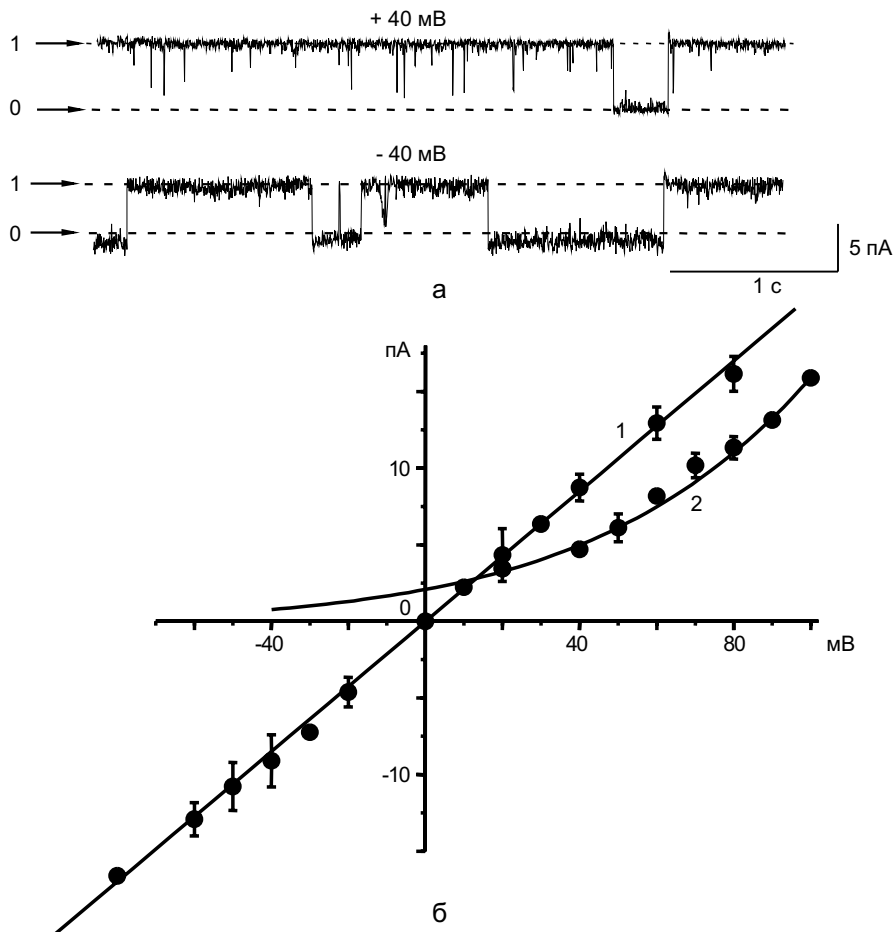


Рис.2. Катіонний канал внутрішньої мембрани ядерної оболонки гранулярних нейронів зубчастої звивини: а – записи роботи каналу при різних потенціалах, стрілками вказана кількість відкритих каналів; б - вольт-амперна характеристика катіонного каналу внутрішньої ядерної мембрани у симетричному розчині 150 ммоль/л KCl (1) та при заміні розчину у робочій камері на тріс-Cl (2)

фат – 1, АТФ – 0,5 і ріанодин – 1 нмоль/л. Концентрація вільного  $\text{Ca}^{2+}$  у цьому розчині становила 150–170 нмоль/л. За таких умов не спостерігалось будь-яких інших каналів, крім тих, які ми реєстрували у розчині КСІ. Таким чином, можна припустити: ріанодинові та інозитолтрифосфатні рецептори відсутні на мембранах ядер гранулярних нейронів гіпокампа, або ж їх щільність настільки мала, що вони не можуть бути зареєстровані електрофізіологічними методами.

Отже, на мембранах ядерної оболонки гранулярних нейронів зубчастої звивини було виявлено три різні типи іонних каналів, один з яких знаходиться на зовнішній ядерній мембрані, а два інших – на внутрішній.

## ОБГОВОРЕННЯ

У цій роботі було вперше виявлено іонні канали на мембранах ядерної оболонки нейронів зубчастої звивини гіпокампа та описано їх основні біофізичні властивості.

З літературних джерел відомо, що серед хлорних каналів на внутрішньоклітинних мембранах експресуються представники родини CLIC (від англ. chloride intracellular channels) і деякі з родини CIC (від англ. chloride channels) [11]. Молекулярна структура цих каналів була досліджена завдяки клонуванню їх генів [4, 11]. Всі CIC є гомодимерами. Вони демонструють два чітко виражені, однакові за амплітудою рівні провідності, що свідчить про наявність у

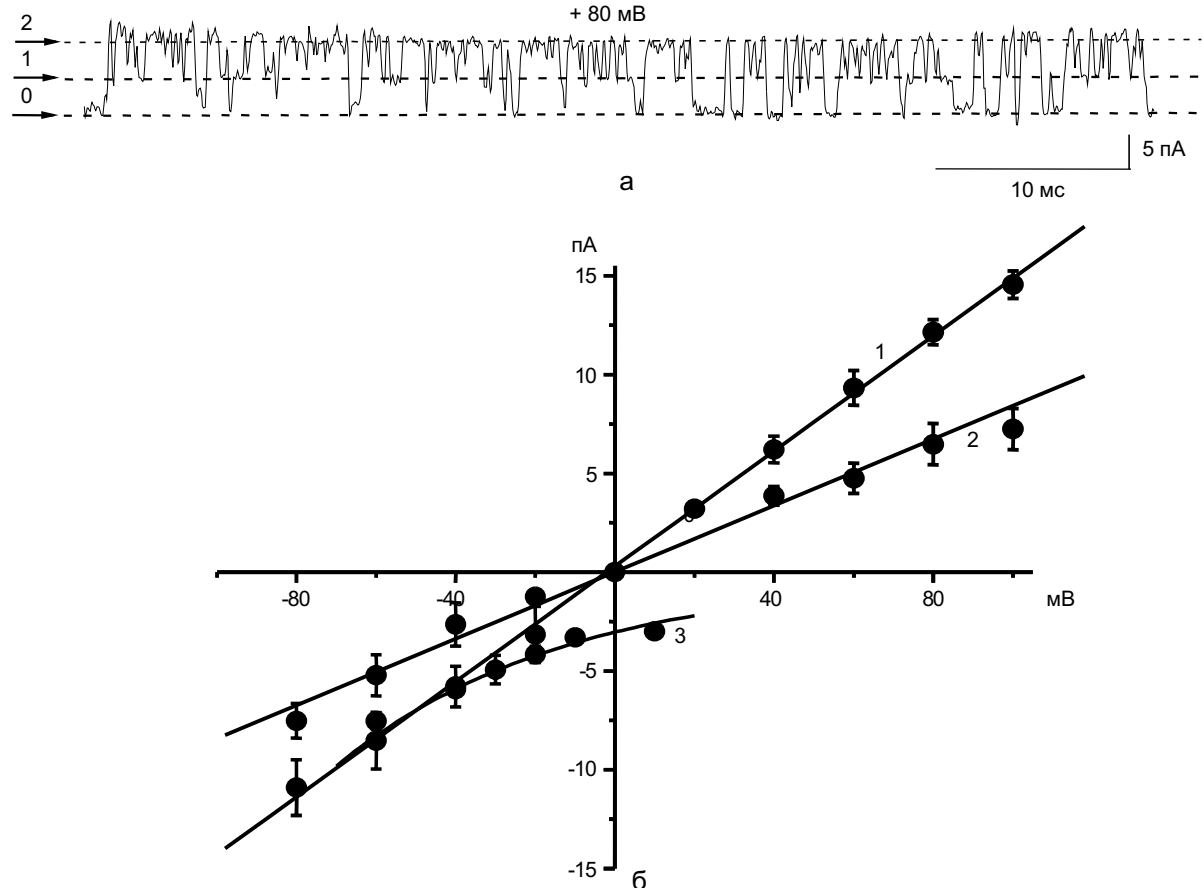


Рис.3. Аніонний канал внутрішньої мембрани ядерної оболонки: а – зразок роботи каналу при потенціалі +80 мВ, стрілками вказана кількість відкритих підрівнів; б – вольт-амперна характеристика аніонного каналу, який був зареєстрований на внутрішній ядерній мембрані гранулярних нейронів зубчастої звивини гіпокампа у симетричному розчині 150 ммоль/л КСІ (1 – максимальний рівень провідності, 2 – другий рівень провідності), та коли всередині піпетки знаходився стандартний розчин, а у робочій камері – еквімолярний розчин глюконату калію (3)

молекулі каналу двох ідентичних пор. Більшість СІС характеризуються чіткою потенціалзалежністю, крім того, мають подвійний ворітний механізм: по-перше, кожна з пор каналу може закриватися незалежно, по-друге, є механізм, який одночасно закриває обидві пори [11, 12]. СІС були знайдені у саркоплазматичному ретикулумі, в ендосомах і синаптичних везикулах, ендоплазматичному ретикулумі, лізосомах [4, 11, 18], проте, ймовірно, вони можуть бути локалізовані й на інших внутрішньоклітинних мембранах.

Першим представником СІС, який вдалося виділити та клонувати є аніонний канал ядерних мембран клітин нирки корови р64. Це досить маленька молекула (з молекулярною масою 64 кДа), що має лише одну трансмембранну ділянку. СІС були знайдені на мембрані ядерної оболонки [20]. Ці канали виявлені майже в усіх тканинах ссавців, але найбільший рівень їх експресії спостерігається в серці, нирках, легенях і скелетних м'язах.

Враховуючи літературні дані, ми можемо припустити, що хлорні канали, які було зареєстровано на зовнішній мембрані ядер гранулярних нейронів зубчастої звивини належать до родини СІС, адже вони мають лише один рівень провідності та не демонструють чіткої потенціалзалежності. Проте ці канали можуть належати до іншої (ще неописаної) родини внутрішньоклітинних хлорних каналів.

Щодо каналів, які були зареєстровані на внутрішній ядерній мембрані, то вони, ймовірно, належать до родини СІС, адже у наших реєстраціях ці канали мали два однакових за значенням рівні провідності.

На цей час є низка робіт, в яких, використовуючи електрофізіологічні методи, були описані малоселективні катіонні канали на внутрішніх мембранах ядер клітин [1-5, 7, 9, 13, 16]. Проте вони не були виділені та клоновані, адже досі не знайдено їх блокатори, чи інші молекули, за допомогою яких ці канали можна було ідентифікувати поза мембраною.

У цій роботі ми також виявили катіонні канали на внутрішній ядерній мембрані гранулярних нейронів гіпокампа. Цікаво, що при роботі з ядрами інших типів нейронів, а саме клітин мозочка [13] та пірамідальних нейронів СА1 ділянки гіпокампа [1], були зареєстровані катіонні канали з іншими біофізичними властивостями, а саме з різними провідностями та характером роботи. Іонні канали на цих двох об'єктах демонстрували чітку потенціалзалежність, зокрема на великих позитивних потенціалах вони були майже весь час відкриті, а на великих негативних (від  $-40$  мВ для нейронів СА1 ділянки гіпокампа і  $-60$  мВ для нейронів Пуркін'є мозочка) вони блокувалися. У іонних каналів ядерних мембран гранулярних нейронів зубчастої звивини потенціалзалежність не була так яскраво виражена. Таким чином, можна припустити, що на внутрішній мембрані ядер різних нейронів експресуються подібні, але не ідентичні, катіонні канали.

Щодо хлорних каналів, то в ядрах нейронів мозочка та СА1 ділянки гіпокампа ми також знайшли канали, селективні до  $Cl^-$ , проте з іншим характером роботи та провідністю [1, 13]. Ймовірно, це явище пов'язане з тим, що ядерні оболонки цих клітин виконують різні функції.

Було показано, що на внутрішній мембрані ядер нейронів Пуркін'є [13] та пірамідних нейронів [1, 6] наявні інозитолтрифосфатні рецептори. Ядерні оболонки цих нейронів виконують функцію кальцієвого депо [13, 14]. У свою чергу, на ядрах гранулярних нейронів нам не вдалося зареєструвати кальцієві канали, тому ми припускаємо, що їх ядерна оболонка не бере участь у кальцієвій регуляції подібним чином.

Результати, які були отримані в наших дослідженнях дають підґрунтя стверджувати, що експресія на мембранах ядерної оболонки іонних каналів з різними біофізичними властивостями може бути пов'язана з відмінностями в кальцієвій сигналізації нейронів різних типів.

**O.A. Fedorenko, D.E. Duzhyy, S.M. Marchenko**

## **NUCLEAR ION CHANNELS OF THE GRANULE CELLS FROM THE DENTATE GYRUS**

The nuclear envelope is a part of the endoplasmic reticulum which surrounds the genetic apparatus of the cell. Using the patch-clamp technique we have investigated ion channels in the membranes of nuclei isolated from the neurons of the dentate gyrus. Our research has shown that there is anionic (329 pS) on the outer and anionic (157 pS) and cationic (179 pS) channels on the inner nuclear membrane. Ion channels in the nuclear envelope of the neurons of the dentate gyrus differ much from ones of the neurons of the cerebellum and CA1 region of the hippocampus. This fact proves that different types of neurons express different sets of ion channels in the nuclear membranes. The physiological role of the ion nuclear channels in the granule cells is not clear but they may be important for the ion balance between the cytoplasm and the lumen of the nuclear envelope as well as endoplasmic reticulum of the cell if the latter represents an adequate model of granule of the some parts of ER.

*Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Science of Ukraine, Kyiv*

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Дужий Д.С., Федоренко О.А., Марченко С.М. Дослідження іонних каналів внутрішньої ядерної мембрани пірамідних нейронів гіпокампа // Фізіол. журн. – 2006. – **52**, №2. – С. 18.
2. Федоренко О.А., Волкова Т.М., Марченко С.М., Новий катіонний канал ядерної мембрани Т-лімфоцитів // Там само. – №1. – С.17–21.
3. Assandri R, Mazzanti M. Ionic permeability on isolated mouse liver nuclei: influence of ATP and Ca<sup>2+</sup> // J. Membr. Biol. – 1997. – **157**, №3. – P.301–309.
4. Debska G., Kicinska A., Skalska J., Szezewyk A. Intracellular potassium and chloride channels: an update // Acta biochimica polonica. – 2001. – **48**, №1. – P.137–144.
5. Draguhn A., Borner G., Beckmann R. et al. Large-conductance cation channels in the envelope of nuclei from rat cerebral cortex // J. Membr. Biol. – 1997. – **158**, №2. – P.159–166.
6. Fedorenko O.A., Dujyy D.E., Marchenko S.M. Ca<sup>2+</sup> channels in the nuclear membrane of hippocampal pyramidal neurons // Acta Physiol. – 2006. – 186. – P.183.
7. Franco-Obergon A., Wang H., Clapham D.E. Distinct ion channel classes are expressed on the outer nuclear envelope of T- and B-lymphocyte cell lines // Biophys. J. – 2000. – **79**. – P.202–214.
8. Gerasimenko O.V., Gerasimenko J.V., Tepikin A.V., Petersen O.H. ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca<sup>2+</sup> from the nuclear envelope // Cell. – 1995. – **80**, №3. – P.439–444.
9. Guihard G., Proteau S., Payet M.D. et al. Patch-clamp study of liver nuclear ionic channels reconstituted into giant proteoliposomes // FEBS Lettr. – 2000. – **476**. – P.234–241.
10. Humbert J.P., Matter N., Artault J.C. 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. – 1996. – **271**, № 1. – P.478–485.
11. Jentsch T.J., Stein V., Weinreich F., Zdebek A.A. Molecular structure and physiological function of chloride channels // Physiol. Rev. – 2001. – **82**. – P.503–568.
12. Kourie J.I. pH-modulation of chloride channels from the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle // J. Membr. Biol. – 1999. – **167**, №1. – P.73–83.
13. Marchenko S.M., Yarotsky V.V., Kovalenko T.N. et al. Spontaneously active and InsP3-activated ion channels in cell nuclei from rat cerebellar Purkinje and granule neurones // J. Physiol. – 2005. – **565**, №15. – P. 897–910.
14. Marchenko S.M., Thomas R.C. Nuclear Ca<sup>2+</sup> signalling in cerebellar Purkinje neurons // Cerebellum. – 2006. – **5**, №1. – P.36–42.
15. Matzke M., Aufsatz W., Gregor W. et al. Ion transporters in the nucleus? // Plant Physiol. – 2001. – **127**. – P.10–13.
16. Mazzanti M., DeFelice L.J., Cohn J., Malter H. Ion channels in the nuclear envelope // Nature. – 1990. – **22**, № 343(6260). – P.764–767.
17. Minn A.J., Velez P., Schendel S.L. et al. Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes // Ibid. – 1997. – **23**. – №385(6614). – P.353–357.
18. Nagasawa M., Kanzaki M., Lino Y. et al. Identification of a novel chloride channel expressed in the endoplasmic reticulum, Golgi apparatus and nucleus. // J.Biol.Chem. – 2001. – **276**, №23. – P.20413–20418.
19. Rousseau E., Michaud C., Lefebvre D. et al. Reconstitution of ionic channels from inner and outer membranes of mammalian cardiac nuclei // Biophys. J. – 1996. – **70**, №2. – P.703–714.
20. Tonini R., Ferroni A., Valenzuela S.M. et al. Functional characterization of the NCC27 nuclear protein in stable transfected CHO-K1 cells // FASEB J. – 2000. – **14**, №9. – P.1171–1178.

*In-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ*

*Матеріал надійшов до редакції 27.12.2006*