

На правах рукопису

УДК 577.352.5

ЛЮБАНОВА Ольга Петрівна

**ФУНКЦІОНАЛЬНА ЕКСПРЕСІЯ  
ПОТЕНЦІАЛЗАЛЕЖНИХ КАЛЬЦІЄВИХ КАНАЛІВ  
НЕЙРОНІВ ВЕЛИКИХ ПІВКУЛЬ МОЗКУ  
ТА МОЗОЧКУ ЩУРІВ В ООЦИТАХ *Xenopus laevis***

Спеціальність:  
Фізіологія людини та тварин - 03.00.13

**А в т о р е ф е р а т**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ - 1993

AB 28.353

ЛННБ України ім.В.Стефаніка



00813985 (Y)

Робота виконана в Інституті фізіології ім.О.О.Богомольця АН України.

Науковий керівник - академік **Костюк П.Г.**

Офіційні опоненти:

академік АН України  
доктор біологічних наук

**Сюк В.І.**  
**Бурдига Ф.В.**

Провідна установа - Інститут фізіології Київського Університету  
ім. Тараса Шевченка

Офіційний захист дисертації відбудеться " 1 " декабря 1993 р.  
на засіданні спеціалізованої ради Д-016.15.01 при Інституті фізіології  
ім.О.О.Богомольця АН України за адресою м. Київ, вул. Богомольця, 4.

З дисертацією можна познайомитися в бібліотеці Інституту фізіології  
ім.О.О.Богомольця АН України.

Автореферат розісланий " 28 " октября 1993 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої ради  
доктор біологічних наук

**З.О.Сорокіна-Маріна**

ЛННБ ім. В. Стефаніка  
АН України

1

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

АКТУАЛЬНІСТЬ ПРОБЛЕМИ. В результаті досліджень останніх років було виявлено три типи кальцієвих каналів, так звані канали L, N, та T типів (Fox 87). Нещодавно це сімейство каналів було доповнено новим представником - P каналом, який має відносно високий потенціал активації та переважно зустрічається в нейронах Пуркін'є та в гранулярних клітинах мозочку ссавців (Llinas 89, Bertolino 92). Головною характерною рисою P-типу каналу є його висока стійкість до таких ефективних кальцієвих антагоністів як дигідропіридини та  $\omega$ -коноксин, і в той же час специфічна чутливість до окремих фракцій токсину павука *Agelenopsis aperta*.

Останніми роками на межі молекулярної біології, біохімії, мембранної біофізики та клітинної нейрофізіології народився новий перспективний напрямок у вивченні іонних каналів, який базується на програмованому синтезі білків в ооцитах *Xenopus* за допомогою еукаріотичних РНК, одержаних з різноманітних організмів від рослин до ссавців. Цей метод, вперше описаний Гьордоном на початку 70-х років (Gurdon 71), в наш час є найефективнішим засобом дослідження функціональної експресії білків. За допомогою нього вже вивчено функціональну експресію рецепторів та каналів з різних тканин. Одним із засобів тестування біологічної активності білків рецепторів та іонних каналів, які вбудовані в мембрану клітини, є методи електрофізіологічної реєстрації інтегральних електричних струмів та струмів мікроділянок мембрани (петч-клемп). З другого боку, при використанні експресованих в мембрані ооцитів білків, як моделей іонних каналів та рецепторів, можна вивчати технічно складні питання електрофізіології у тісному зв'язку з проблемами біогенезу цих білкових структур. Для вирішення фундаментальних питань біогенезу іонних каналів, а саме I - механізм експресії генів та II регуляція, трансляція та посттрансляційні модифікації, вбудова канальних білків у мембрану - не без успіху використовувались біохімічні та молекулярнобіологічні підходи (Catterall 88, Rossie 87, Pinchuk 89, Малишева 89), але найбільш перспективним в цьому плані виявляється метод експресії чужерідної генетичної інформації в ооцитах, особливо тепер, коли стало можливим здійснювати в них

синтез мутантних білків після ін'єкції клонованих ДНК, які були піддані генетичним маніпуляціям (McKnight, 80).

Вибір теми наших досліджень був зумовлений тим, що однією з недостатньо визчених галузей є функціональна експресія потенціалзалежних кальцієвих каналів. Зокрема, надзвичайно важливими виявляються питання про причини гомогенності популяції каналів, що експресуються, та про можливість незалежної експресії різних типів кальцієвих каналів, про механізми біогенезу, а також про можливість використання таких "живих моделей" каналів для більш детального вивчення їх структури, електрофізіологічних властивостей та їх фармакологічної модуляції.

ЦІЛІ роботи полягали в тому, щоб: 1/ з'ясувати можливість диференційованої експресії в ооцитах *Xenopus* кальцієвих каналів, що керуються потенціалом в нейроніє великих півкуль мозку та мозочку шурів;

2/ показати, що кальцієві канали F типу, які неінактивуються та мають високий пог. г активації, являють собою окремий, генетично обумовлений тип каналів.

ЗАВДАННЯ роботи: 1. Виділення двох препаратів функціонально активної сумарної матричної РНК з великих півкуль головного мозку та мозочку шурів.

2. Індукування за допомогою мРНК експресії потенціалзалежних кальцієвих каналів в мембрані ооцитів *Xenopus*.

3. Порівняльне дослідження електрофізіологічних та фармакологічних властивостей експресованих кальцієвих каналів з різних структур головного мозку шурів.

НАУКОВА НОВИЗНА: Показано, що сумарна РНК головного мозку шурів, після фракціонування в градієнті сахарози, приводить до появи в мембрані ооцитів потенціалзалежних кальцієвих каналів, амплітуда струмів через які досягає 1 мкА, в той час як після ін'єкції індивідуальних та полі(А)<sup>+</sup> мРНК амплітуди струмів, що експресуються були в 5-10 разів менші (Могі 91, Герасименко 91). Цей факт змушує по новому підійти до питання про молекулярну структуру кальцієвих каналів та функціональну роль окремих субодиниць.

Вперше встановлено, що в результаті ін'єкції препаратів РНК, виділених з різних структур мозку, в мембрані осцитів відбувається диференційована експресія кальцієвих каналів за концентраційно-залежним механізмом. При цьому ін'єкція мозочкової РНК призводить до появи в осцитах каналів, які за своїми властивостями близькі до Р типу, а ін'єкція РНК великих півкуль - до появи каналів, близьких до N типу - кальцієвих каналів нейрональних мембран.

Експресовані кальцієві канали мозочку не виявляють чутливості до дигідропіридинів та  $\omega$ -конотоксину, але пригнічуються GTX - фракцією отрути павука *Agelenopsis aperta*, а експресовані кальцієві канали великих півкуль проявляють стійкість до дигідропіридинів та GTX, але пригнічуються  $\omega$ -конотоксином.

Представлені результати дають можливість стверджувати, що відокремлення особливого Р-типу кальцієвих каналів є генетично обумовленим.

ПРАКТИЧНА ЦІННІСТЬ РОБОТИ. Одержані дані вносять суттєвий вклад в розвиток уявлень про біогенез мембранних іонних каналів та їх молекулярну структуру.

Вони мають фундаментальне значення для дослідження питань просторової функціональної гетерогенності мембранних іонних каналів в ЦНС.

Представлені результати можуть бути використані для дослідження та інтерпретації специфічних фармакологічних впливів на нейрональні процеси, які залежать від кальцію.

АПРОБАЦІЯ РОБОТИ. Матеріали дисертації доповідались та обговорювались на засіданні сектору нейрофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця АН України, на радянсько-німецькому симпозиумі "Збудливі мембрани" (1991 р., Київ), представлені у вигляді стенової доповіді на міжнародній робочій нараді "Механізми кальцієвого гомеостазу клітин, які збуджуються" (1993 р., Київ), а також неодноразово доповідалися та обговорювались на загальноінститутському семінарі з молекулярної фізіології.

ОБ'ЄМ ТА СТРУКТУРА ДИСЕРТАЦІЇ. Дисертація складається з вступу, літературного огляду, описання методів та експериментальної частини, обговорення, 8 висновків та списку літератури з 198 найменувань. Робота викладена на 104 сторінках друкованого тексту (без малюнків), ілюстрована 23 малюнками та 1 таблицею.

За матеріалами дисертації опубліковано 5 робіт.

## МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ

Експресію потенціалзалежних кальцієвих каналів викликали ін'єкцією сумарної РНК, яка була виділена за однією з модифікацій методу Аффрея (Auffray, 80) та Стародуба (Стародубо 86) з використанням хлористого літію та сечовини. Для одержання РНК використовували передній мозок (близько 5 г) та мозочок (близько 3 г) трижневіх шурят. Кожний препарат окремо гомогенізували на льоду протягом 20 секунд в десятикратному об'ємі охолодженого до  $-10^{\circ}\text{C}$  розчину: 3М LiCl та 6М сечовини. Гомогенат витримували 16 годин при температурі  $-10^{\circ}\text{C}$ , після чого центрифугували 20 хвилин при 16 тис г на центрифугі K-24. Осад двічі депротеїнізували фенолом. Після цього РНК переосаджували тричі 70% етанолом (Clemens 84). Вихід сумарної РНК, як правило, становив близько 0,1% від маси використаної тканини.

Кількість та чистоту препарату РНК оцінювали на спектрофотометрі SF-23 за його поглинанням при 260 та 280 нм. Поглинання розчину 1 мг/мл РН дорівнює 23 одиницям оптичного поглинання при 260 нм, незабруднена РНК має відношення поглинань при 260 та 280 нм 2.0 (Clemens 84).

Після виділення сумарної РНК було проведено розділення її за розміром в градієнті щільності сахарози (Clemens 84). Градієнт сахарози 10-25% створювали за допомогою змішувача фірми "Pharmacia" та перистальтичних насосів. Розчини сахарози готували на буфері: 10 мМ тріс-хлор; 0,1% меркаптоетанол; 10 мМ EDTA, 0,1% лауріл-саркозил (рН 7,5). Головна проблема при фракціонуванні полягає в тому, щоби уникнути агрегації РНК під час проходження через сахарозу. Агрегацію можна зробити мінімальною, якщо прогріти РНК перед фракціонуванням. Для цього 0,5 мл буферу, склад якого вказано вище, і в якому міститься 400 мкг мРНК, прогрівали 90 с при температурі  $+65^{\circ}\text{C}$ , швидко охолоджували до кімнатної температури та нашаровували на градієнт. За маркери бралися РНК з мозку шурів, яка вміщує велику кількість 28 S та 18 S рибосомальних РНК. Центрифугували за допомогою центрифуги "Beckman Spinco", ротор SW-40, протягом 12 годин при 32 000 об/хв та температурі  $15^{\circ}\text{C}$ . Після цього градієнт розділяли на фракції з об'ємом 0,2 мл, відбираючи мікропіпеткою від меніску, та осаджували етанолом на протязі 16 годин. Поглинання вимірювали за допомогою спектрофотометру SF-23.

Для ін'єкції ми відбирали фракції 20-25 S и 30-40 S; як такі що найбільш відповідають мРНК високопорогових кальцієвих каналів (Miyami 88).

В дослідях використовувались дорослі самки *Xenopus laevis*, які мають близько 30 000 крупних ооцитів з діаметром більше як 1 мм. Ізоляцію, культивування та ін'єкцію ооцитів проводили за методом Колмена (Colmen 84). З метою тривалого зберігання життєздатності ооцитів, фрагменти яєчника ретельно промивали у модифікованому сольовому розчині Барта, який вміщує антибіотики, одразу після одержання їх з жаби та розділяли на окремі ооцити. На наступний день ооцити обробляли ферментним розчином: 0,2% колагенази ("Sigma", Type 1) та 0,1% інгібітору трипсину ("Reanal") на протязі 1 години при температурі 34 С з метою вивільнення їх від шару фолікулярних клітин. Далі клітини культивували протягом 7-10 днів в чашках Петрі зі щільністю приблизно 30 клітин на 5 мл розчину Барта в інкубаторі, який підтримує температуру 18-20 С. Для мікроін'єкцій мРНК використовувалася оригінальна установка з пневматичною подачею дозованого об'єму РНК в ооцити.

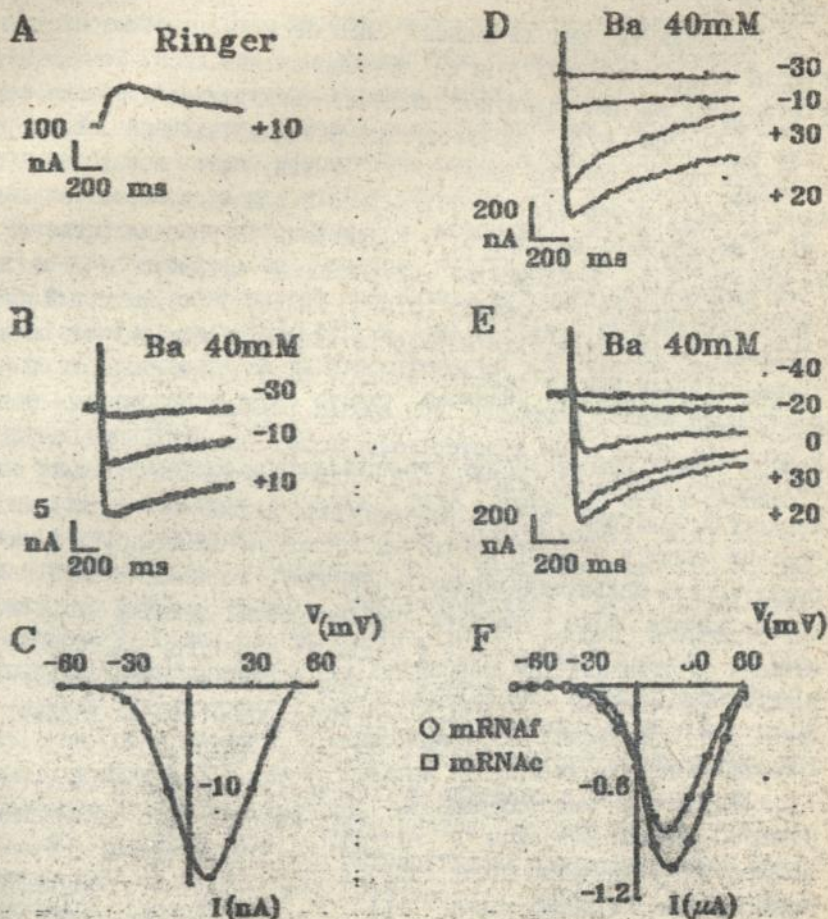
Електрофізіологічні експерименти проводились на п'ятий-сьомий день після ін'єкції мРНК з використанням стандартної методики двохелектродної фіксації потенціалу. Потенціалний електрод виготовлявся з скляних трубок Pyrex, мав опір 2-3 МОм, заповнювався 3 М розчином KCl. Струмий мікроелектрод виготовлявся з боросілікатного скла, мав опір 0,5-0,8 МОм і заповнювався розчином такого складу: ( в мілі молях на 1 літр ): CsCl -500, ТЭА-ОН - 100, EGTA - 10, HEPES- 10 (рН 7.3). Натрієві струми реєструвались в розчині Рінгера. Струми через кальцієві канали вимірювались у безхлорному розчині, який вміщував іони барію ( в мілімолях на 1 літр): NaOH- 50; Ba(OH) - 40; КОН - 2; HEPES - 10; значення рН 7,3 доводили метансульфою кислотою ("Sigma", США). З метою усунення натрієвих струмів до наведеного розчину додавали 1 мігомоль/л тетродотоксину (ТТХ) або еквімолярно замінювали NaOH гідроксидом тетраетиламонію - ТЭА-ОН ("Sigma", США).

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.

На першому етапі роботи наше завдання полягало в одержанні двох препаратів функціонально активної, інактивної сумарної РНК великих півкуль мозку та мозочку (в подальшому РНКл та РНКм відповідно). Фракціонування обох препаратів РНК в залежності від розміру нами було проведено в градієнті концентрації сахарози. Денситограма розділення вказує на те, що препарат вміщує як 18 S і 28 S рибосомальні РНК, так і велику кількість інших РНК, а саме - багато високомолекулярних мРНК розміром більш як 30 S. Низькомолекулярна дифузна зона продуктів розпаду РНК практично відсутня. Такі результати фракціонування свідчать про те, що нами були виділені препарати функціонально активної сумарної РНК (РНКл і РНКм), які за даними швидкісного зонального ультрацентрифугування в сахарозному градієнті структурно цілісні і, відповідно, задовольняють вимогам до препаратів мРНК, які призначені для ін'єкції в ооцити *Xenopus laevis* з метою ефективного синтезу функціональних іонних каналів.

## 1. Електрофізіологічні властивості експресованих кальцієвих каналів.

Як було показано раніше, натійний неін'єкований ооцит *Xenopus laevis* у відповідь на деполяризацію мембрани генерує три компоненти трансмембранного струму - вхідний кальцієвий, та вихідні: залежний від Са хлорний та калієвий (Barish 83, Milodi 84, Герасименко 91). При підтримуючому мембранному потенціалі ( $V_m$ ) -80 мВ в нормальному розчині Рінгера деполяризація мембрани до +10 мВ імпульсом довжиною 1 с викликала струм вихідного напрямку, який складається з основного компоненту, що інактивується, амплітуда його дорівнювала 200 нА, та невеликого стаціонарного компоненту. Ці компоненти вихідного струму формуються відповідно Са-залежним хлорним струмом та калієвим струмом, які маскують значно менший за амплітудою кальцієвий струм протилежного напрямку (мал.1). Ендогенний кальцієвий струм можна виявити при заміні розчину Рінгера на барієвий розчин, в якому іони хлору замінені на метилсульфонат. В результаті такої заміни вихідний струм суттєво знижувався, що давало можливість виявити струм, який мав досить "повільну" кінетику і незначну амплітуду, яка не перевищувала 30 нА, що збігається з літературними даними. Оскільки іони барію можуть переносити струм тільки через кальцієві канали, тому цей вхідний струм, що залишився, швидше за все, є проявом активації власних



Мал.1. Трансмембранні струми та їх вольтамперні характеристики. А, В, С - контрольні оцити, D - оцити, ін'єковані мРНК з великих півкуль (mRNA f), E - оцити, ін'єковані мРНК з мозочку (mRNA c), F - вольтамперні характеристики ін'єкованих оцитів.

кальцієвих каналів нативних ооцитів. Середня амплітуда вхідного струму, який переноситься іонами барію в контрольних ооцитах, складала  $16 + 10$  нА ( $n=25$ ). Власний кальцієвий струм характеризується високим порогом активації ( $-40$  мВ), а максимуму досягає приблизно при  $+10$  мВ.

Для ооцитів, які ін'єковані РНКп та РНКм, картина струмів, які реєструються в розчині Рінгера суттєво змінювалась. На 3-5-ий день у відповіді на деполяризуючі зміщення мембранного потенціалу до  $-50$  мВ можна було спостерігати швидкий вхідний струм, який свідчить про експресію додаткових каналів, які ефективно блокуються ТТХ ( $10$  ммоляр), що збігається з нашими попередніми даними, які були одержані на струмах, індукованих мРНК цілого мозку (Герасименко 81). Водночас з виникненням швидкого ТТХ-чутливого натрієвого струму в ооцитах після ін'єкції мРНК спостерігався суттєвий зріст амплітуди вихідного хлорного струму, що непрямым чином свідчило про збільшення входу ззовні іонів кальцію в ооцит при деполяризації мембрани. При заміні розчину Рінгера на барієвий розчин (Ба  $40$  мМ), ми спостерігали появу значного за амплітудою повільного вхідного струму. В обох групах ін'єкованих ооцитів амплітуди барієвих струмів перевищували відповідні амплітуди контрольних ооцитів у  $40-50$  разів. Ми оцінювали це як появу в мембрані ооциту нових кальцієвих каналів. Причому, експресія кальцієвих каналів завжди була присутня при експресії швидких натрієвих каналів. Значних відмінностей у значенні амплітуди барієвого струму між групами ооцитів, ін'єкованих РНКп и РНКм не було виявлено: для РНКп-викликаних струмів амплітуда була  $800 + 250$  нА ( $n=24$ ), а для РНКм-викликаних струмів -  $700 + 200$  нА ( $n=32$ ).

Ми також не відзначили суттєвих відмінностей в обох групах в кінетиці макроструму та потенціалзалежності його активації, що видно з вольтамперних характеристик кальцієвих струмів, які індуковані РНКп та РНКм (тривалість деполяризуючого зміщення потенціалу  $1000$  мс). Після аналізу вольтамперних характеристик, ми дійшли висновку, що барієві струми, які були індуковані РНКп та РНКм, активувались, починаючи з мембранного потенціалу близько  $-40 + 5$  мВ і досягали максимального значення при  $+15$  мВ. Подальший рости деполяризації призводив до зменшення вхідного струму. Реверсія його відбувалася при потенціалі  $+60$  мВ, що найбільш ймовірно зв'язано з неповним усуненням вихідного струму. На підставі цих даних як ці, так і інші експресовані струми були віднесені нами до високо-

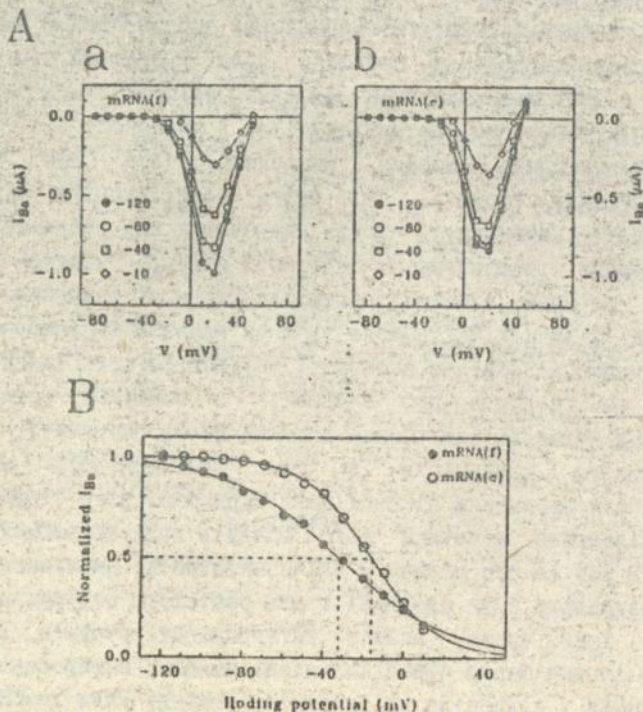
порогового типу.

Відомо, що кальцієва провідність мембрани клітин, забезпечується функціонуванням декількох типів каналів, які відрізняються за своєю кінетикою, залежністю від потенціалу, та фармакологією (Bean 89, Fox 87b, Llinas 89,92). Таким чином, при введенні в оцит як сумарної РНКп, так і сумарної РНКм, можна було б чекати одночасної експресії в ньому кальцієвих каналів різних типів, тим більше, що в нейронах тих ділянок мозку, з яких ми одержували наші зразки РНК, було показано присутність поруч з високопороговими каналами низькопорогових кальцієвих каналів. Так у роботі, проведеної на нативних нейронах Пуркін'є мозочку 1-3-тижневих щурів (Regan 91), показано, що частина клітин має кальцієвий струм, подібний Т-струму периферічних нейронів, всі Пуркін'є клітини мають високопорогові кальцієві струми, які повільно інактивуються та не виявляють чутливості до дигідропіридинів, і тільки невеликий компонент високопорогового струму проявляє чутливість до Bay K 8644 та нітредипіну.

Для оцінки ймовірної гетерогенності експресованих нами в оцитах *Xenopus* кальцієвих каналів, була проведена серія експериментів, в яких деполяризація мембрани здійснювалась від різних рівнів підтримуючого потенціалу ( $V_h$ ) в діапазоні від -100 до -30 мВ. Така методика широко використовується для розділення трансмембранних струмів, які мають різні порogi активації та стаціонарної інактивації, і для визначення цих параметрів. Аналіз вольтамперних характеристик бар'євого струму, індукованого РНКп, показує, що при високих гіперполяризаційних значеннях  $V_h$  на нисхідних ділянках ВАХ нам не вдалося виявити характерного зламу, який звичайно відповідає активації низькопорогових кальцієвих каналів, що свідчить про експресію в мембрані оцита тільки кальцієвих каналів, які мають високий поріг активації. Зі зсувом підтримуючого потенціалу в бік деполяризації можна було спостерігати зменшення пікової амплітуди бар'євого струму, незначне сповільнення кінетики його спаду в ході тривалої деполяризації. В той же час максимум ВАХ практично не зміщувався. Аналогічні результати були одержані і для бар'євого струму, індукованого РНКм. Таким чином, аналіз інтегральних струмів, які переносяться іонами барію через кальцієві канали, експресовані в мембрані оцитів у відповідь на ініціацію сумарних РНКп та РНКм, дозволяє зробити висновок про однорідність популяції цих каналів. Отже,

одержані значення залежності відносної амплітуди бар'єрового струму у відповідь на фіксовану деполяризацію від рівня підтримуючого мембранного потенціалу можна розглядати як криві стаціонарної інактивації гомогенної популяції вископорогових кальцієвих каналів. Експериментальні значення задовільно вкладаються на теоретичну криву стаціонарної інактивації, одержану з формули Больцмана  $I/I_0 = [1 + \exp((V - V_{1/2})/k)]^{-1}$ , де  $V$  - потенціал половинної інактивації, а  $k$  - фактор крутості. Розрахунки показали, що найкраще співвідношення для кальцієвих каналів, індукованих РНКп може бути одержано при  $V = -32$  мВ та  $k = 28$  мВ, в той час як для каналів, індукованих РНКм, ці значення складають  $-16$  мВ та  $16,6$  мВ відповідно (мал.2).

Мал.2. А - вольтамперні характеристики бар'єрових струмів осцитів, індукованих РНКп (а - mRNA f) та РНКм (b - mRNA c), та відповідні криві стаціонарної інактивації (В).



## 2. Фармакологія експресованих каналів.

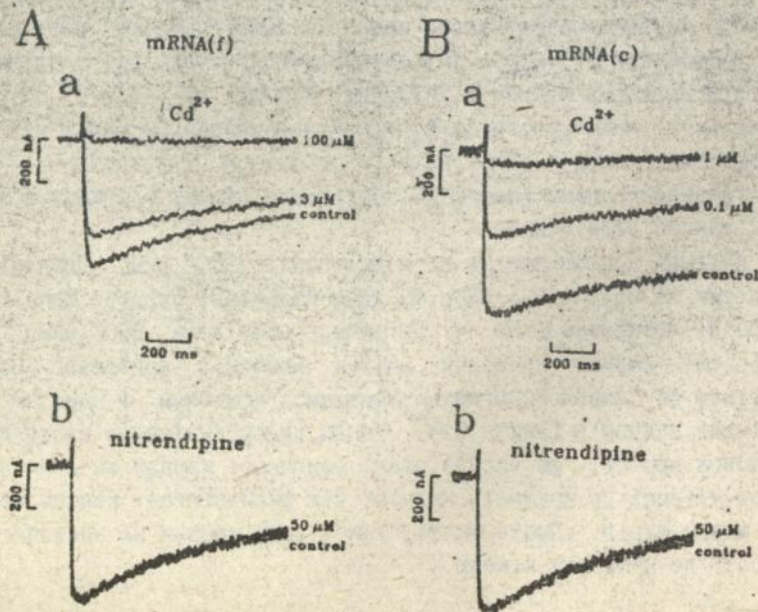
Оцінити фармакологічну чутливість кальцієвих каналів, експресованих в ооцитах, ми змогли з допомогою ряду кальцієвих ефекторів, які мають специфічну дію на різні типи кальцієвих каналів: іони кадмію, іони нікелю, дигідропіридинової антагоніст нітрендипін та агоніст Bay K 8644, та природні токсини: пептидний блокатор  $w$ -CgTx з морського равлика *Conus geographus*, цілсна отрута американського павука *Agelenopsis aperta* та одна з його фракцій -FTX.

Відомо, що іони кадмію є ефективними неорганічними блокаторами високопорогових кальцієвих каналів (Tsien 88). Їх блокуюча дія також проявляється і на експресованих в ооцитах *Xenopus* кальцієвих каналах кардіоміоцитів (Logy 89) та нейронів мозку (Герасіменко 91). В процесі нашої роботи ми вивчали вплив іонів кадмію на експресовані кальцієві канали переднього мозку та мозочку. Виявилось, що кадмій пригнічує бар'євий струм як в ооцитах, ін'єкованих РНКп, так і в ооцитах, ін'єкованих РНКм, хоча ефективність блокування при цьому в обох групах різна.  $K_d$  для РНКп-викликаного струму складало 20 мкМ, а для РНКм-викликаного струму всього лиш 0,1 мкМ (мал.3). Іони кадмію в концентрації 100 мкМ повністю пригнічували бар'євий струм через експресовані канали в обох групах ооцитів, що використовувалось нами для його повного відокремлення від залишкових струмів, які переносяться через інші типи каналів. Це здійснювалось шляхом віднімання стійкого до кадмію струмового компоненту, який рееструється після додавання 100 мкМ іонів кадмію в бар'євий розчин, від струму, одержаного у відсутності кадмію. Всі наведені нами реєстрації бар'євого струму одержані в результаті такого віднімання.

Катіони нікелю навіть в концентрації 300 мкМ, практично не впливали на індуковані РНКп та РНКм кальцієві струми. Хоча показано що Ni ефективно ( $K_d$  - 52 мкМ, макс.доза 300 мкМ) блокує кальцієві струми нативних клітин мозочку, приблизно 30% яких протікає по низькопороговим каналам, подібним T-каналам периферичних нейронів (Regan 91). Таким чином, ми маємо змогу зробити висновок про те, що експресовані мозочкові канали на два порядки більш чутливі до катіонів кадмію, ніж експресовані канали переднього мозку шурів. Проте як ті, так і інші канали не виявляють чутливості до катіонів нікелю.

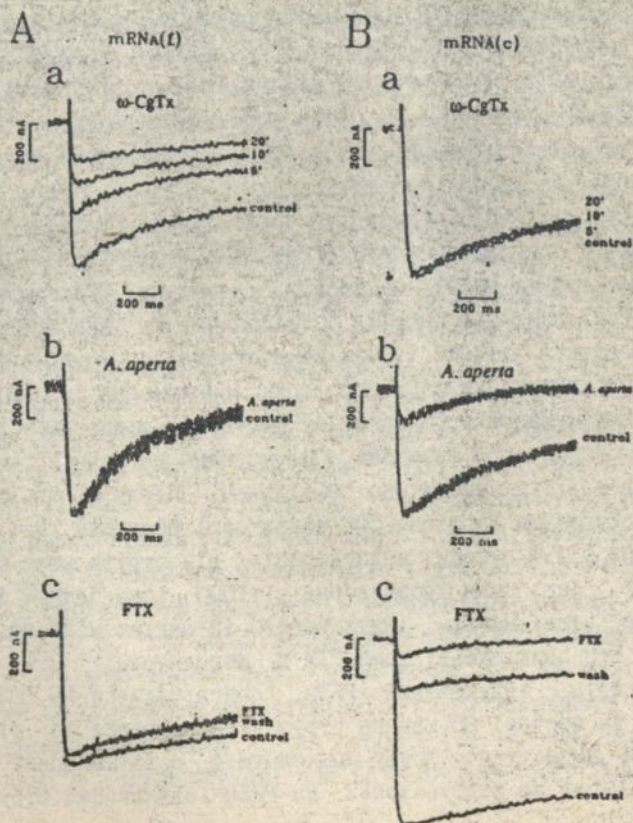
Оскільки експресовані нами в обох групах осцитів канали виявляють себе як такі, що мають високий поріг активації та слабо інактивуються, ми поставили за мету дослідити їх реакцію на речовини дігідропіридинового ряду, такі як Bay K 8644 (10 мкмоль/л), кальцієвий агоніст, та нітрендипін, (50 мкмоль/л) кальцієвий антагоніст, які добре відомі за своєю дією на L-тип кальцієвих каналів периферичних нейронів (Nowusky 85 a,b; Fox 87 a,b). Приготування розчину, який вміщує нітрендипін, а також досліди з його використанням проводились при слабкому освітленні. Реєстрації струмів здійснювались на максимумі вольт-амперної характеристики в контрольному розчині та через 10 с після прикладання фармакологічних агентів. На чутливість до нітрендипіну нами було перевірено по 17, а на чутливість до Bay K 8644 - по 15 клітин з кожної групи. В результаті експериментів було встановлено, що експресовані нами, РНКп- та РНКм-індуковані високопорогові кальцієві канали, виявились нечутливими до дігідропіридинів, що дозволяє виключити їх належність до L-типу кальцієвих каналів.

Мал.3. Вплив кадмію та нітрендипіну на бар'єві струми, індуковані мРНК в великих пієкулях (А) та мозочку (В) щурів.



Для визначення належності експресованих кальцієвих каналів до другого, N-типу; високопорогових каналів, ми вивчали дію на них  $\omega$ -CgTx - ефективного блокатора N-струму в периферичних нейронах (McCleskey 87). Аплікація  $\omega$ -конотоксину в камеру здійснювалась на максимумі вольтамперної характеристики, ефект реєстрували через 10 с після початку аплікації, з рівними проміжками часу на протязі 30-40 хвилин. Дія  $\omega$ -CgTx на індуковані РНКп та РНКм кальцієві канали значно відрізнялась. Токсин в концентрації 10 мкМ ніяк не впливав на кальцієві канали оцитів, ін'єктованих РНКм, що виключає можливість віднесення цих каналів до N-типу (мал.4).

Мал.4. Вплив  $\omega$ -конотоксину, *A.aperta* токсину та FTX на бар'єрі струми, індуковані мРНК з великих пікуль (А) та мозочку (В) щурів.



В ооцитах же, ін'єкованих РНКп, цей пептидний блокатор в концентрації 1 мкмоль/л пригнічує кальцієвий струм на протязі 20 хвилин до рівня  $33 \pm 12\%$  ( $n=12$ ) від контрольного значення амплітуди. Залишковий компонент струму виявився досить стійким, не дивлячись на збільшення концентрації токсину. Після відмивки відновлення струму не відбувалось. Висока чутливість РНКп-ін'єкованих ооцитів до  $w-CgTx$  дає підстави для віднесення кальцієвого струму, експресованого в них, до N-типу. В'ясутність чутливості РНКм-індукованих струмів до  $w-CgTx$  виключає можливість віднесення їх до N типу кальцієвих каналів.

Як було показано в ряді робіт (Carbone, Swandulla 89; Adams 89; Bindokas 89) нейротоксини з отрут павуків являються можливими лігандами пресинаптичних та дендритних високопорогових кальцієвих каналів, в зв'язку з цим вони широко використовуються для виділення цих каналів в чистому вигляді. З отрути павука *Agelenopsis aperta* одержано декілька токсинових фракцій, які з різною ефективністю інгібують високопорогові кальцієві канали в різних об'єктах (Lin 90, Llinas 89, Mintz 92 a, Mintz 92 b, Venema 92). Проведені за останні декілька років роботи в цій області свідчать про те, що найбільш специфічно токсини цього павука впливають на високопорогові кальцієві канали P-типу (Llinas 89, Mori 91). Ми вивчали дію цілісної отрути та однієї з її фракцій - FTX - на експресовані в ооцитах високопорогові кальцієві канали. При цьому дія цілісної отрути та FTX на канали, індуковані РНКп та РНКм, виявилась протилежною дії  $w-CgTx$ . Цілісна отрута використовувалась нами у розведенні 1:10000. Вона не впливала на струм, індукований РНКп, але пригнічувала бар'євий струм, викликаний ін'єкцією РНКм. Останній зменшувався в присутності отрути до рівня  $20 \pm 8\%$  ( $n=15$ ) від свого контрольного значення. Нечутливий до отрути компонент, що залишався, був достатньо стабільним. Після 20 хв відмивання струм відновлювався до рівня 50% початкової величини. Слід відзначити, що при більш високих концентраціях дія отрути може бути менш специфічною. Так, при розведенні 1:1000 вона блокує 65% струму через кальцієві канали, індукованого ін'єкцією мРНК всього мозку (Lin 90). При прикладанні нами FTX в концентрації 0,5 мкмоль/л бар'євий струм, індукований РНКм, пригнічувався на 80%. Після відмивання на протязі 20 хвилин струм відновлювався до рівня 40% контрольної амплітуди. Зсуву максимумів вольтамперних характеристик при цьому не відбувалось. На РНКп-індукований струм ефекту

практично не спостерігалось, що співпадає з результатами, одержаними нами при роботі з цілісною отрутою. Проведені дослідження підтверджують дані про те, що токсини отрути павука *Agelenopsis aperta* виявляють специфічну дію при блокуванні як кальцієвих каналів клітин нативного мозочку (Llinas 89, Bertolino 92), так і кальцієвих каналів, експресованих в результаті ін'єкції мозочкової РНК (Mori 91). Вибіркова чутливість РНК-індукованих високопорогових кальцієвих каналів до токсинів павука *A. aperta* дозволяє зробити припущення про їх найбільш вірогідну приналежність до Р-типу кальцієвих каналів.

### ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.

Представлені дані підтверджують відомий висновок про те, що РНК, виділена з мозку, здатна ефективно транскрибуватися в ооцитах *Xenopus*, що призводить до синтезу і вбудовуванню в їх мембрану потенціалзалежних іонних каналів (Dascal 86, Kaneko 87, Lester 88, Snutch 90, Lin 90).

Нам вдалося виділити два препарати функціонально активної сумарної РНК потенціалзалежних кальцієвих каналів характерних для нейронів великих півкуль мозку та мозочку шурів. Одержання експресії іонних каналів, індукованих природньою РНК, не є простою задачею. Шляхом варіювання умов виділення РНК нам вдалося зменшити ступінь впливу негативних факторів. Був зменшений, наскільки це можливо, час від початку діставання мозку шурів до його гомогенізації в розчині, який інгібує нуклеази. На протязі всієї процедури виділення РНК знаходилась під захистом сильних інгібіторів нуклеаз, серед них білкові - гепарин та РНКазин (інгібітор рибонуклеаз з плаценти людини, "Sigma"). При використанні фенольних методів виділення, РНК була депротейнізована сумішшю (1:1:1) фенола, хлороформа та калій-ацетатного буферу (рН 5.0); при цьому втрати РНК в інтерфазі значно зменшувались. Має значення те, що нами використовувалась для ін'єкцій сумарна РНК, розділена в сахарозному градієнті. Відбирались фракції розміром 20-25 S і 30-40 S, які найбільш відповідають мРНК високопорогових кальцієвих каналів (Miyami 88). Таким чином, всі застосовані заходи призвели до одержання найбільш якісного ін'єкційного препарату.

Порівнюючи результати цієї роботи з нашими попередніми дослідженнями з використанням полі(А)+ мРНК з мозку великої рога-

тої худоби та шурів (Федулова 88, Герасіменко 91), можна зробити висновок, що процеси, які призводять до експресії нових типів іонних каналів в ооциті у відповідь на введення сумарних РНК, розділених в сахарозному градієнті, ідуть більш інтенсивно. Цей висновок витікає перш за все з порівняння амплітуд бар'євих вхідних струмів. Зареєстровані в представлений роботі амплітуди струмів досягали значення 800-1000 нА, в то час як індуковані полі(А)+ мРНК струми не перевищували 400 нА. Після ін'єкції індивідуальних мРНК субодиниць кальцієвих каналів L-типу амплітуди струмів досягали 1000 нА (Dascal 86). Ця величина може бути порівняна з величиною струму, одержаного нами, не дивлячись на те що в нашій сумарній РНК концентрації специфічних мРНК субодиниць кальцієвих каналів на три порядки нижчі, ніж в препараті індивідуальної РНК L-каналу. Такі результати свідчать про те, що наша сумарна, фракціонована в градієнті сахарози РНК, вміщує крім індивідуальних РНК кальцієвих каналів ще якісь фактори, природу яких ще треба встановити, але які безумовно позитивно впливають на ефективність експресії каналних білків.

Цікаво співставити наші результати по експресії сумарної РНК мозочку з даними після ін'єкції мРНК, одержаної за допомогою кДНК кальцієвого каналу клітин Пуркін'є та гранулярних клітин мозочку кролика (визначеного як VI) (Mori 91). Експресований VI канал виявився високопороговим, потенціалзалежним, нечутливим до ніфедипіну та  $\omega$ -конотоксину, токсин *A. aperta* пригнічував його приблизно на 40%. Максимальна амплітуда бар'євого струму через цей канал не перевищувала 30 нА. Однак під час спільної ін'єкції мРНК та субодиниць L-каналу скелетних м'язів кролика, асоційованих з ДГП-рецептором, амплітуда струму збільшилася в 200 разів, при цьому параметри макроструму та фармакологічна чутливість каналу не змінилися. Механізм, який лежить в основі ефекту спільної експресії невідомий. Можна припустити, що та субодиниці збільшують експресію VI кальцієвого каналу шляхом стабілізації білку або полегшуючи його вбудовування в мембрану.

Цікаві з точки зору біогенезу каналів являється питання, які властивості каналів визначаються їх індивідуальними РНК, а які РНК тих субодиниць, які у різних каналів схожі і не є каналоспецифічними. З приведених літературних даних видно, що "хімерний" кальцієвий канал, одержаний японськими вченими, схожий за своїми фармакологічними властивостями з кальцієвим каналом,

індукованим нашою РНК з мозочку. З цього витікає що, певно, індивідуальна РНК зумовлює суцільно специфічні властивості експресованого Р-каналу, в основному фармакологічні, в той час як РНК неспецифічних субодиниць лиш підсилюють їх проявлення. Дані японських авторів свідчать про те, що мозок, очевидно, вміщує білки гомологічні або ідентичні з субодиницям кальцієвих каналів скелетних м'язів. Мабуть, різноманітні типи потенціалзалежних кальцієвих каналів з різних тканин проявляють подібність структури на рівні субодиниць. Кінцева відповідь на це питання безумовно потребує подальших досліджень.

Не дивлячись на те, що канали, експресовані в нашій роботі, індуковані мРНК з різних відділів мозку, вони проявляють схожу потенціалзалежність активації, яка дозволяє класифікувати їх як високопорогові. На підставі відведення інтегральних струмів ми схильні вважати, що експресовані кальцієві канали в кожній групі не гетерогенні. В той же час відомо, що більшість типів центральних нейронів ссавців таку гетерогенність мають. Дивним є те, що ми не спостерігали експресії низькопорогових каналів, які керуються потенціалом (Т-тип), хоча цей тип каналів достатньо поширений і в великих півкулях мозку, і в мозочку (Bean 89), а наша сумарна РНК не могла не вміщувати компонентів, які кодуєть білки цих каналів. Можна припустити, що в оциті відбувається концентраційно-залежний вибір (з мРНК, присутніх в препараті, що використовується для ін'єкцій) на користь експресії одного з типів кальцієвих каналів, який найбільш поширений в цій тканині. Можливо це зв'язано з тим, що ендогенні кальцієві канали оцита являються високопороговими, причому їх субодиниці схожі з субодиницями потенціалзалежних кальцієвих каналів L-типу нейрональних мембран (Singer-Lahat 92). Власні механізми трансляції оциту, а також ендогенні фактори, які забезпечують транспорт та вбудовування в мембрану синтезованих білків, не можуть не впливати на результати експресії. В літературі не зустрічається даних про експресію в оцитах низькопорогових каналів.

На підставі електрофізіологічних досліджень, високопорогові кальцієві канали нейронів ЦНС розподіляють на три основні типи - N, L і P (Kostyuk 88, Tsien 88, Llinas 89). Одержані в представленій роботі дані вказують на те, що, хоча експресовані в наших експериментах високопорогові кальцієві канали нейронів великих

півкуль та мозочку проявляють багато схожих рис, за декотрими характеристиками вони відрізняються, що дає можливість віднести їх до двох різних типів каналів. Ці відмінності стосуються саме параметрів стаціонарної інактивації (потенціал половинної інактивації та фактор крутості), при одночасній годібності їх вольтамперних характеристик. В більшій мірі відмінності між двома групами каналів проявляються в їх фармакологічних властивостях.

Аналізуючи наші результати, можна зробити висновок, що в зв'язку з тим, що ані канали, індуквані РНКп, ані індуквані РНКм, не виявляють чутливості до дигідропіридинів, можливість віднести їх до І типу кальцієвих каналів виключається. Зареєстрований нами бар'євий струм після ін'єкції препарату сумарної РНК великих півкуль (РНКп) за своєю потенціалзалежністю та фармакологією нагадує високопороговий (ВПІ або N-типу) кальцієвий струм нейрональної мембрани, який інактивується. Так, аналогічно ВПІ струму (Kostyuk 88, Bean 89) він виявився нечутливим до таких відомих ефektorів кальцієвої провідності як нітредипін та Bay K 8644. Цей струм не виявляв також чутливості до катіонів нікелю. При цьому він виявляв високу чутливість до катіонів кадмію та до w-CgTx - ефективному блокатору високопорогових кальцієвих каналів нейрональної мембрани (Gray 88) -, ніяк не реагуючи при цьому на цілістний токсин павука A.aperta та FTX. В роботі (Umbach 87) було показано, що ендогенні кальцієві канали ооцита являються стійкими до w-CgTX, ось чому неповне блокування бар'євого струму ін'єктованих ооцитів ми зв'язуємо з присутністю в ньому ендогенного компонента, амплітуда якого для різних ооцитів може помітно варіювати. В той же час експресований нами струм за своєю стаціонарною інактивацією відрізняється від природного ВПІ струму: ми одержали для РНКп-індукованого струму  $V_{1/2} = 32$  мВ і  $k = 28$  мВ, а для кальцієвого струму N типу відповідні значення, виміряні в розчині, який вміщує 10 мМ кальцію, дорівнюють -70 мВ і 12,5 мВ (Fox 87). Ми припускаємо, що ці відмінності між нативними нейрональними каналами та каналами, які експресуються в ооцитах, можна пояснити безпосереднім впливом власної системи трансляції ооцита на процес експресії білків кальцієвих каналів.

Головною відзначеною рисою кальцієвих каналів, індукованих РНКм являється їх нечутливість до w-CgTx і в той же час специфічна чутливість до A.aperta отрути та FTX. Експресовані канали цієї групи виявились нечутливими також до нітредипіну, Bay K 8644 і

катионів нікелю. Така фармакологія дозволяє віднести їх до P-типу кальцієвих каналів, притаманних клітинам Пуркін'є та гранулярним клітинам мозочку (Llinas 89).

Крім різної чутливості індукованих РНК1 та РНК2 кальцієвих каналів до  $w$ -CgTx та FTX, ми виявили відмінності в їх стаціонарній інактивації та ефективності блокування іонами кадмію. Крива стаціонарної інактивації для експресованих каналів мозочку була менш крутою ( $k = 16,5$  мВ) і мала зсув в бік більш позитивних потенціалів ( $V_{1/2} = -16$  мВ) порівняно з кривою для каналів переднього мозку ( $k = 28$  мВ,  $V_{1/2} = -32$  мВ). Важко з впевненістю сказати, чи відображує крива стаціонарну інактивацію оригінальних кальцієвих каналів в обох випадках, чи представляє властивості стаціонарної інактивації модифікованих в результаті трансляції в ооциті кальцієвих каналів, оскільки для природних мозочкових клітин, які не мають низькопорогових кальцієвих струмів, канали, нечутливі до дигідропіридинів та  $w$ -конотоксину, при  $V_h = -120$  мВ в розчині, що містить 5 мМ Ca, відповідні величини дорівнюють:  $k = 14,7 + 2,1$  мВ,  $V_{1/2} = -45,8 + 3,1$  мВ (Regan 91). Що стосується блокування іонами кадмію - відомо, що вони з високою блокуючою ефективністю впливають на експресовані в ооциті кальцієві канали, незалежно від типу тканини-джерела мРНК (Lester 88, Lester 89, Umbach 87, Dascal 86). Наші дані підтверджують цей висновок, причому, експресовані в ооциті мозочкові канали виявились на два порядки більш чутливими до іонів кадмію, ніж канали переднього мозку.

Таким чином, цілком достовірно ми можемо заключити, що кальцієві канали, індуковані в ооцитах Xenopus сумарними РНК мозочку та переднього мозку щурів, належать до двох різних типів, і на підставі їх різноманітної чутливості до природних токсинів (FTX і  $w$ -CgTx) можуть бути ідентифікованими як канали P1 і N1 типів (відповідно) (див. таблицю 1). Цей висновок відображує той факт, що мозочок та передній мозок являються тими структурами мозку ссавців, нейрони яких переважно експресують саме ці потенціалзалежні типи кальцієвих каналів, хоча і інші типи каналів тут присутні. Відзначні риси, одержані під час порівняння експресованих каналів в двох групах ооцитів, дозволяють робити висновки про генетичну обумовленість окремих типів кальцієвих каналів. Подальші, більш глибокі дослідження на рівні клонування ДНК, які кодуєть білки каналних субодиниць, дадуть можливість розшифрувати структуру різних типів кальцієвих каналів, що зробить картину класифікації каналів більш повною.

Таблиця 1

Електрофізіологічні параметри	РНКп-індуковані канали	РНКи-індуковані канали
Порог активації	-45 мВ	-35 мВ
Максимальна амплітуда	800 ± 250 нА	700 ± 200 нА
Потенціал при $A_{\text{макс.}}$	+ 15 мВ	+ 15 мВ
Стац. інактивація:		
$V_{1/2}$	-32 мВ	-16 мВ
$k$	28 мВ	16.6 мВ
Блокування $\text{Cd}^{2+}$ ( $K_d$ )	20 нкМ	0.1 нкМ
Дія $\text{Ni}^{2+}$ (300 нкМ)	не блокує	не блокує
Чутливість до дигідропіридинів:		
Вау К 8644 (10 нкМ)	відсутня	відсутня
нітрендипін (50 нкМ)	відсутня	відсутня
Дія $\omega\text{-CgTx}$	блокує оборотно 1 нкМ	не діє 10 нкМ
Чутливість до токсинів павука <u>Agelenopsis aperta</u>	відсутня	блокує, частково оборотно FTX-0.5 нкМ

## ВИСНОВКИ.

1. Виділені та охарактеризовані два препарати інтактноі, функціонально активної, розділеноі в градієнті сахарози сумарної РНК з великих півкуль мозку та мозочку шурів.

2. Вперше продемонстрована диференційована експресія різних типів кальцієвих каналів, які керуються потенціалом, в результаті ін'єкції сумарних фракціонованих РНК з різних ділянок мозку шурів.

3. За допомогою методу двохелектродної фіксації потенціалу на мембрані досліджено електрофізіологічні та фармакологічні властивості експресованих потенціалзалежних кальцієвих каналів в ооцитах жаби *Xenopus laevis* після ін'єкції в них сумарних РНК великих півкуль мозку та мозочку шурів (РНКп і РНКм).

4. При проведенні порівняльного аналізу встановлено, що індуквані РНКп та РНКм кальцієві канали мають схожу потенціалзалежність активації та залежність від часу параметрів інактивації, що дозволяє віднести їх до високопорогового типу потенціалзалежних кальцієвих каналів.

5. Показано, що криві стаціонарної інактивації обох експресованих кальцієвих каналів помітно відрізняються, при цьому кожна з них задовільно описується формулою Больцмана. Значення потенціалу половинної інактивації та фактору крутості для каналів великих півкуль дорівнюють  $-32$  мВ і  $28$  мВ, а для каналів мозочку відповідно  $-16$  мВ і  $16,6$  мВ.

6. Встановлено, що за своїми фармакологічними та електрофізіологічними характеристиками:

а/  $w$ -конотоксинчутливий кальцієвий канал, експресований в ооцитах в результаті ін'єкції сумарної РНК великих півкуль, найбільш близький до високопорогового кальцієвого каналу, що інактивується, тобто N типу;

б/ GTX-чутливий кальцієвий канал, експресований в результаті ін'єкції сумарної РНК мозочку, найбільш близький до високопорогового каналу P типу.

7. Відмінності в результатах ін'єкції РНКп та РНКм дають підстави для підтвердження присутності в нейрональній мембрані окремого, генетично обумовленого типу високопорогових кальцієвих каналів - P типу.

8. Одержані дані являються основою для дослідження біогенезу та просторової функціональної гетерогенності мембранних іонних каналів в ЦНС за допомогою системи трансляції ооцитів *Xenopus*, і можуть бути використані для вивчення специфічних фармакологічних впливів на кальційзалежні нейрональні процеси.

*Перелік робіт, опублікованих за тематикою дисертації.*

1. Герасименко О.В., Костюк П.Г., Любанова О.П., Федулова С.А., Шуба Я.М. Входящие потенциалуправляемые токи экспрессированные в ооцитах *Xenopus* в ответ на введение мозговой мРНК. // *Нейрофизиология*, 1991, т.23, N 3, с. 344-353.
2. Герасименко О.В., Костюк П.Г., Любанова О.П., Федулова С.А., Шуба Я.М. Экспрессия w-конотоксинчувствительных потенциалуправляемых кальциевых каналов в ооцитах ксенопус после инъекции мРНК из мозга крыс. // Тезисы докладов на рабочем совещании по программе "Клеточная сигнализация и ее использование для управления функцией клетки и клеточной биотехнологии", Москва, февраль 1991.
3. Герасименко О.В., Костюк П.Г., Любанова О.П., Федулова С.А., Шуба Я.М. Экспрессия потенциалуправляемых ионных каналов в ооцитах *Xenopus laevis* после инъекции мРНК из мозга крыс. // *Биол. мембр.*, 1991, т. 8, N 11, с. 1130-1131.
4. Любанова О.П., Герасименко О.В., Джуря И.А., Герасименко Ю.В., Шуба Я.М. Интенсификация экспрессии потенциалуправляемых кальциевых и натриевых каналов в ооцитах лягушки *Xenopus*, инъекцированных суммарной РНК из мозга шурів. // *Нейрофизиология*, -1993, N 6.
5. O.V.Gerasymenko, P.G.Kostyuk, O.P.Lyubanova, I.A. Dzhura, Ya.M.Shuba. Differential expression of calcium channels from rat cerebellum and forebrain in *Xenopus* oocytes. // *Neuroscience*, 1993, in press.



1941 JAN 10 10 10 AM '41

RECEIVED JAN 10 1941

Папір N 1. Обсяг 1 друк. лист. Зам 32. Тираж 100

-----  
Підписано до друку 27.09.1993 р. Формат 60×84 1/16

464200

AB 28.353

**AB 28.353**