НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ.О.О.БОГОМОЛЬЦЯ
ФІЗІОЛОГІЧНЕ ВІДДІЛЕННЯ ЛІВЕРПУЛЬСЬКОГО УНІВЕРСИТЕТУ

На правах рукопису

ГЕРАСИМЕНКО Юлія Володимирівна

ДОСЛІДЖЕННЯ ТРАНСПОРТУ ІОНІВ КАЛЬЦІЮ В ІЗОЛЬОВАНИХ ЯДРАХ З КЛІТИН ПЕЧІНКИ МИШІ

03.00.05 - Біофізика

Автореферат
дисертації на здобуття вченого ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 1996

ЛННБ України ім.В.Стефаника
00779398 (0)
Ав 33.'43

ідділенні Ліверпульського університету (Великобританія), та у відділі загальної фізіології нервової системи Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України

Науковий керівник -- академік, директор Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України Платон Григорович Костюк.

Офіційні опоненти:

1)член-кореспондент НАН України Кришталь Олег Олександрович (Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України)

2)кандидат біологічних наук Гіммельрейх Ніна Германівна (Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України)

Провідна установа: біологічний факультет Національного Університету ім. Тараса Шевченка

Захист відбудеться << 20 >> березня 1996 р. о 14[00] на засіданні Спеціалізованої ради Д-01.13.01 при Інституті фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України за адресою м.Київ, вул.Богомольця 4.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України

Автореферат розісланий << 19 >> лютого 1996 р.

Вчений секретар
Спеціалізованої ради
доктор біологічних наук З. О. СОРОКІНА-МАРІНА

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Декілька десятиріч вчені звертаються до проблеми вивчення ролі та механізмів транспорту іонів кальцію в клітинах. Кальцій - найбільш поширений катіон в організмі хребетних, який контролює цілий ряд внутрішньоклітинних процесів. Також відома важлива роль іонів кальцію у регуляції деяких фундаментальних процесів у ядрах клітин. Недавно було показано, що злиття ядерних везикул потребує мобілізації іонів кальцію (Sullivan, 1993), а також в ядрах знайдені кальцієві АТФази саркоплазматичного типу (Lanini, 1992), інозитол трисфосфатні рецептори (ІФ3)(Nicotera, 1990, Meszaros, 1993) та системи синтезу інозитол трисфосфата (Divecha, 1993). Нині не існує загальноприйнятої моделі транспорту кальцію у ядрах. Одне з основних питань - проникливість ядер. Раніше вважалось, що ядерна оболонка проникliва для іонів, а також речовин з молекулярною вагою до 10-20 кДа (Lang, 1986). Недавно було опубліковано декілька робіт, в яких доповідалось про існування різниці між концентраціями вільного кальцію в нуклеоплазмі та цитозолі, особливо під час збудження клітин (Himpens, 1992, Shankar, 1993). В інших роботах вважається, що такі данні є артефактами, а концентрації кальцію між цитозолем та нуклеоплазмою швидко вирівнюються (Al-Mohanna, 1989, Brini, 1993, Gillot, 1993). На підставі експериментів з ізольованими ядрами знайдено АТФ-залежне накопичення кальцію у ядерний простір та ІФ3-викликаний вихід кальцію у цитоплазму (Nicotera, 1989, 1990). Безпосередні вимірювання концентрацій вільного кальцію в нуклеоплазмі за допомогою специфічно синтезованого всередині ядер екворіну вказують на значну проникливість ядерної оболонки для

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

кальцію (Brini 93). З наведеного вище важко зрозуміти, яким чином функціонують механізми кальцієвого гомеостазу на рівні ядра клітини.

Мета роботи : з"ясувати транспорт іонів кальцію в поодиноких ізольованих ядрах з клітин печінки миші за допомогою кальцій-чутливих флуоресцентних барвників, використовуючи флуоресцентну та конфокальну мікроскопію.

Задачі роботи:

1.Дослідити проникність ядер для іонів кальцію.

2.Виявити локалізацію місць АТФ-залежного акумулювання кальцію в ядрі.

3. Визначити роль та локалізацію ІФ3-рецепторів у ядрі.

4. Вивчити можливу участь ріанодинових рецепторів у регуляції транспорту кальцію у ядрі.

Наукова новизна. Встановлено, що ядра мають систему кальцієвих депо, розташованих в ядерній оболонці, звідки кальцій вивільнюється за допомогою інозитол трисфосфату та циклічної АДФ-рібози через відповідні рецептори, збільшуючи тимчасово локальний рівень іонів кальцію в нуклеоплазмі. Зміни цитоплазматичного кальцію можуть без перешкоди потрапляти у ядро та активувати кальцій-залежні ядерні процеси.

Практичне значення. Отримані результати - основа для дослідження транспорту іонізованого кальцію в ізольованих ядрах клітин з печінки миші та можуть бути використовані для вивчення кальцій-залежних ядерних процесів.

Апробація роботи. Матеріали дисертації доповідалися і обговорювалися на семінарах секції Нейрофізіології Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України (Київ 1994, 1995), конференції Фізіологічного Товариства Великобританії(Великобританія, Ліверпуль 11-13квітня 1994),Гордонівській

конференції на тему кальцієвої сигналізації (США, Хеннікер, 18-23 червня 1995).

Обсяг і структура дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, характеристики методів та експериментальної частини, обговорення, 7 висновків та списку літератури з 141 назви. Робота викладена на 104 сторінках друкованого тексту, іллюстрована 17 малюнками. За матеріалами дисертації опубліковано 3 роботи.

Особистий внесок. Дисертантом був зроблений значний внесок як в експериментальній частині, так і в обробці результатів, а також у підготовці матеріалів до публікації.

МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕННЯ

Для отримання печінки брали двохмісячних мишей (самців лінії СД1). Печінку однієї миші (0.3 грама) поміщали в льодяний буфер А (125 мМ KCl, 2мМ K_2HPO_4, 50 мМ HEPES, 4 мМ $MgCl_2$, 0.1 мМ ЕГТА, 1 мМ АТФ, 1 мг/мл інгібітор тріпсіну, pH 7.0 доводили KOH), потім з допомогою ножиць різали на шматки розміром 2-3 мм додавали 4 мл льодяного буферу А та гомогенізували у гомогенізаторі тефлон-скло ("Jencons Uniform") (10-15 рухів гомогенізаційного поршню). Гомогенат центрифугували при 1000 g протягом 1 хвилини, 4°C. Надосад зливали та ресуспендували осадок в 4 мл буферу А, гомогенізували у гомогенізаторі тефлон-скло ("Jencons Uniform") (6-8 рухів гомогенізаційного поршню) та фільтрували через сито 0.25 мм (Sigma). Після цього центрифугували вдруге у тих самих умовах. Осадок суспендували в 1 мл буферу А та зберігали протягом 2 годин при 4°C. Для дослідження змін кальцію у ядерній оболонці ізольовані ядра витримували 30-45 хвилин при 4°C у буфері А в присутності Фури2-АМ (20мкМ).

Для вивчення змін кальцію у нуклеоплазмі ядра інкубували з декстран-зв"язаними флуоресцентними індикаторами (Фура2 декстран (М.м.70 кДа), кальцій-Грін декстран (М.м.70 кДа) в концентрації 20 мкМ протягом 10 хвилин при 4°С. Навантажені ядра промивалися за допомогою центрифугування при 1000g протягом 1 хвилини, 4°С.

Зразки з ядрами, навантаженими Фурою або декстран-зв"язаними індикаторами, поміщали в експериментальну камеру, з"єднану з системою перфузії та промивали стандартним буфером 5-10 хвилин перед початком кожного експерименту. Експерименти проводили при кімнатній температурі (21°С - 23°С) на поодиноких ізольованих ядрах. Наприкінці експериментів зразки фарбувались етідієм бромідом для контролю.

Фарбування етідієм бромідом в концентрації 5мг/мл, або $DiOC_6$ (3) в концентрації 2.5 мг/мл відбувалось додаванням цих фарбників до суспензії ядер та інкубації протягом 5 хвилин з наступним промиванням стандартним буфером А.

В стандартний розчин додавався $CaCl_2$ до необхідної концентрації іонів кальцію в зовнішньому розчині ядер (100 - 200 нМ), яка перевірялась за допомогою флуоресцентних вимірювань Фурою2. Для калібрування вимірювальної системи використовували стандартні Са2+ - ЕГТА буфери (Molecular Probes).

Вимірювання концентрацій вільних іонів кальцію та розподіл флуоресценції різних фарбників в ізольованих поодиноких ядрах проведено за допомогою Imaging system (Applied Imaging). Розподіл флуоресценції Фури2, Фури2-декстрану, $DiOC_6$(3) та етідію броміду в ізольованих ядрах отримані за допомогою лазерного сканюючого конфокального мікроскопу ODISSEY (Noran Instruments) з об"єктивом Fluor 100X, NA 1.3 oil (Nikon) та щілиною 2.5 мкм.

Зображення, отримані за допомогою конфокального мікроскопа, оброблялися з використанням програми TwoD Analysis(Noran,США).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Розподіл флуоресцентних барвників в ізольованих ядрах

Ізольовані ядра з клітин печінки миші в об"ємі 100 мкл поміщали в проточну камеру та залишали на 1-2 хвилини, щоб дати можливість ядрам осісти на покривне скло. Після цього камеру промивали приблизно 10 мл стандартного розчину та реєстрували флуоресценцію за допомогою ССД-камери флуоресцентної установки (Imaging system). Інтенсивність флуоресценції Фури2 в навантажених Фурою 2-АМ (мембрано-проникливою формою) ізольованих ядрах, (поміряна при збудженні на хвилі 360 нм та емісії більше 510 нм) була негомогенною: низькою в центральній області проекції ядер та максимальною на периферії (n>100). Це наводить на думку про можливу відсутність Фури2 в центральній області ядер, а незначний рівень флуоресценції, що спостерігається, пояснюється флуоресценцією вищих і нижчих шарів оболонки. Щоб перевірити це припущення було використано специфічний маркер ендоплазматичного ретикулуму ДіОС6(3), який повинен фарбувати тільки ядерну оболонку, що є продовженням ендоплазматичного ретикулуму клітин (n=7). Розподіл флуоресценції Фури2 співпадає з флуоресценцією ДіОС6(3). Така схожість у розподілі підтверджує припущення, що Фура2 концентрується не в нуклеоплазмі, а в області ендоплазматичного ретикулуму (та в ядерній оболонці), який залишається з"єднаним з ядром після процедури виділення. Це припущення найкращим чином підтверджено фотознімками, отриманими за допомогою конфокального мікроскопу, який має

високі показники латеральної (~ 0.1 мкм) та вертикальної роздільної здатності (~ 1мкм). Показано, що ні Фури2 (n=9), ні ДіОС$_6$(3) (n=8) немає в нуклеоплазмі: вони сконцентровані в ядерній оболонці.

В інших експериментах спостерігалося, що Фура2 (калієва сіль), добавлена в камеру, швидко проникає в нуклеоплазму, а в ході промивання за допомогою протоку вимивається з нуклеоплазми повільніше ніж з камери, так що напротязі приблизно 30 секунд зменшується флуоресценція ядер. Таким чином, мембрано-непроникліва Фура2 без перешкод проходить через ядерні пори у нуклеоплазму та з неї. Також було знайдено, що флуоресцентно мічені декстрани (М.м. 70,000 Да) швидко проходять через ядерні пори, але після процедури промивання декстрани дуже повільно дифундують з ядра, мабуть, тому що адсорбувалися всередині, даючи можливість вимірювати концентрації вільного кальцію безпосередньо в нуклеоплазмі.

В експериментах використовували флуоресцентні декстрани, мічені флуоресцентними кальцієвими індикаторами (кальцій-грін 1 та Фура 2). Результати, отримані за допомогою флуоресцентної мікроскопії, показують, що інтенсивність флуоресценції центральної області ядер, навантажених Фурою2-декстраном, була більша, ніж на периферії (n>100). Подібний тип розподілу був знайдений і для кальцій-Грін 1-декстрана. Розподіл інтенсивності флуоресценції декстран-зв"язаних кальцієвих індикаторів в ядрах також дуже подібне до розподілу флуоресценції етидію броміду, маркера ДНК та РНК (n>100), (n=8). Така куполоподібна форма розподілення флуоресценції декстранів підтверджує, що акумуляція цих молекул відбувається у внутрішній області ядра (нуклеоплазмі). За допомогою конфокального мікроскопа був також зареєстрований внутрішній розподіл декстран-зв"язаних флуоресцентних індикаторів у ядрах

(n=9), який засвідчує більш гомогенну флуоресценцію, ніж отриману за допомогою Imaging system, завдяки кращому вертикальному розширенню конфокального мікроскопа за рахунок віднімання флуоресценції верхніх та нижчих шарів.

Вхід та вихід Ca2+ в ізольованих ядрах

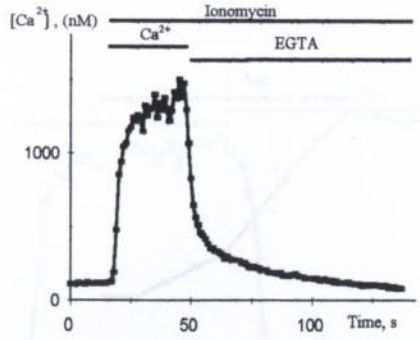
Зміни концентрації зовнішнього кальцію від 10^{-8} М до 1мМ не впливали на флуоресценцію ядер, навантажених Фурою2 в АМ-формі (n=7). Але додавання іономіцину до зовнішнього розчину з високою концентрацією кальцію (1мМ) призвело до насичення відносного сигналу Фури2, а промивання розчином з хелатором кальцію ЕГТА у присутності іономіцину викликало відновлення сигналу (мал.1) (n=10). В іншій серії експериментів ми показали АТФ-залежну акумуляцію іонів кальцію в ядрах (мал.2) (n=12). Вихід акумульованого кальцію стимулювався ІФ3, прицьому ефекти збільшувались при відсутності АТФ. Після вилучення АТФ із зовнішнього середовища, додавання ІФ3 викликало помітне зниження концентрації вільного кальцію в ядрах (мал.3) (n=7). Це підтверджує результати, отримані раніше (Hechtenberg, 1993, Nicotera, 89, 90) в експериментах з суспензіями ізольованих ядер печінки, де було показано існування АТФ-залежного акумулювання іонів кальцію, а також вихід іонів кальцію під впливом ІФ3 та кальмідозоліума. У наших експериментах ми контролювали розподіл індикаторів кальцію, і з"ясували, що всі ці ефекти відбувалися в ізольованих ядрах з кільцевим розподілом Фури2.

Таким чином, ми можемо зробити висновок: кальцієві депо в ядрах знаходяться в ядерній оболонці, де відбувається акумуляція кальцію та його вихід під впливом ІФ3, а не в нуклеоплазмі.

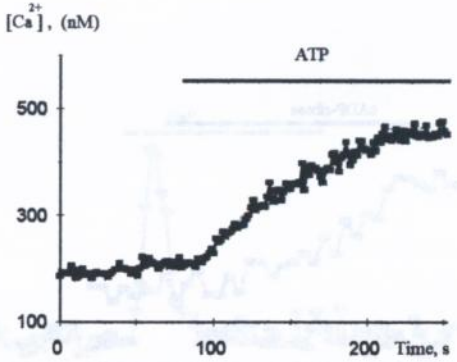
На цей час існує чимало доказів ролі циклічної АДФ-

рібози як посередника виходу іонів кальцію із внутрішньоклітинних депо в деяких системах (Hua, 1994, Lee, 1989, Thorn, 1994), тому ми також досліджували вплив цього реагенту. В роботі показано, що 10 мкМ цАДФ-рібози викликає значний вихід іонів кальцію з ядерної оболонки (мал.4) (n=6).

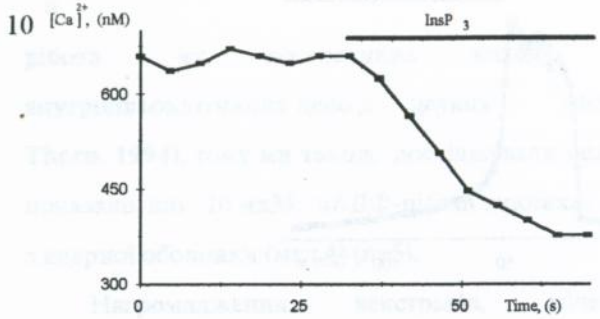
Нагромадження декстранів, мічених кальцій-чутливими індикаторами, у внутрішніх областях ядер створило унікальну можливість слідкувати за змінами концентрації іонів кальцію в нуклеоплазмі. Зміни концентрації кальцію в зовнішньому розчині призводили до швидких змін флуоресценції кальцієвих індикаторів, зв"язаних з декстранами. Підвищення концентрації зовнішнього кальцію до 1 мМ викликало насичення індикаторів в нуклеоплазмі, в той час як додавання ЕГТА (2мМ) призвело до відновлення сигналу, обумовленого виходом іонів кальцію з нуклеоплазми (мал.5) (n=10). Такі швидкі зміни флуоресценції декстран-зв"язаних індикаторів засвідчують, що ядерна оболонка легко проникliва для іонів кальцію. Але стимуляція ядер при відсутності АТФ за допомогою ІФ3 (мал.6)(n=9) та цАДФ-рібози (мал.7)(n=7) викликала швидке транзієнтне підвищення концентрації іонів кальцію всередині ядер, заміряне за допомогою флуоресцентних декстран-зв"язаних кальцієвих індикаторів. Ефект, отриманий при додаванні цАДФ-рібози, свідчить про присутність функціональних ріанодинових рецепторів (Meszaros, 1993), і тому ми провели кілька експериментів щодо впливу ріанодину. Додавання останього викликало невелике, але цілком достовірне підвищення концентрації кальцію в нуклеоплазмі (мал.8)(n=15), яке було транзієнтним та повільнішим порівняно з ефектами ІФ3 та цАДФ-рібози. Декстран-зв"язані флуоресцентні кальцієві індикатори, які нагромаджуються всередині ядра, зареєстрували вихід іонів кальцію з ядерної оболонки і цей



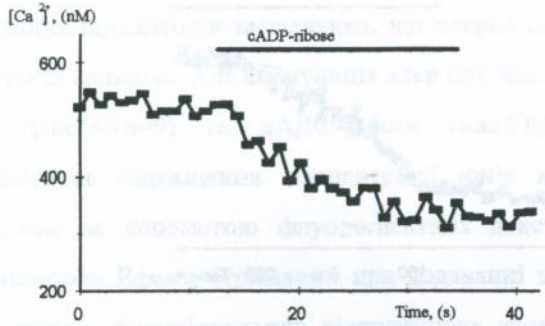
Малюнок 1. Вплив змін концентрацій зовнішього кальцію на концентрацію вільного кальцію в ядерній оболонці поодинокого ізольованого ядра. Послідовні аплікації високої концентрації кальцію (1мМ $CaCl_2$) та ЕГТА (2мМ) до поодинокого ізольованого ядра в присутності 20 мкМ іономіцину. Ядра навантажені Фурою 2- АМ.



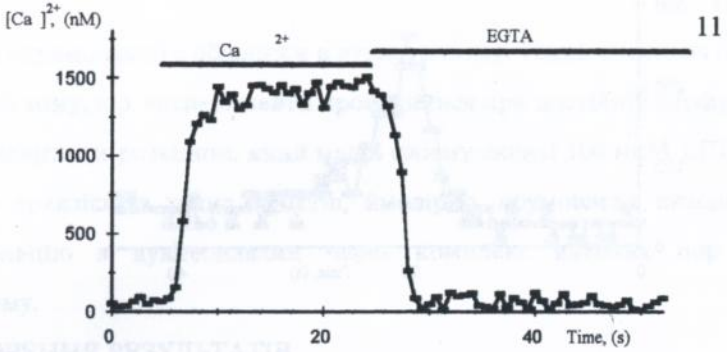
Малюнок 2. Вплив аплікації АТФ (1мМ) на концентрацію вільного кальцію в ядерній оболонці ізольованого ядра в стандартному розчині, який містить 100 нМ вільного кальцію. Ядра навантажені Фурою 2-АМ.



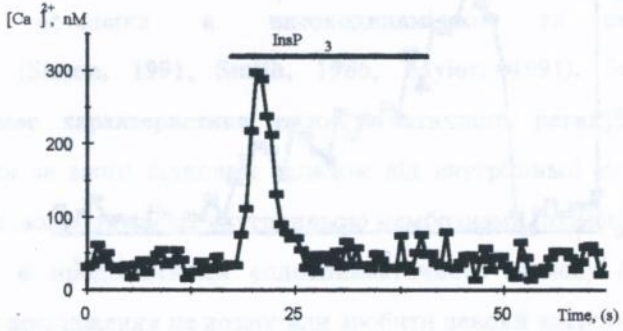
Малюнок 3. Вплив аплікації ІФ3 (10 мкМ) на концентрацію вільного кальцію в ядерній оболонці ізольованого ядра. Ядра інкубували в стандартному розчині з 200 нМ вільного кальцію в присутності 1 мМ АТФ протягом 2 хвилин, потім промивали стандартним розчином без кальцію та АТФ, після чого додавали 10 мкМ ІФ3. Ядра навантажені Фурою 2-АМ.



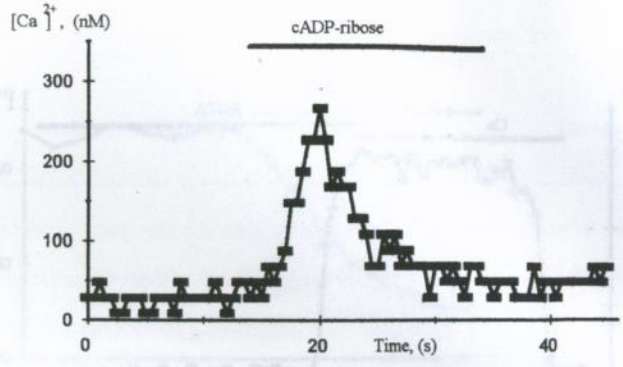
Малюнок 4. Вплив аплікації цАДФ-рібози (10 мкМ) на концентрацію вільного кальцію в ядерній оболонці ізольованого ядра. Ядра інкубіровали в стандартному розчині з 200 нМ вільного кальцію в присутності 1 мМ АТФ протягом 2 хвилин, потім промивали стандартним розчином без кальцію та АТФ, після чого додавали 10 мкМ цАДФ-рібози. Ядра навантажені кальцій-Грін 1-АМ.



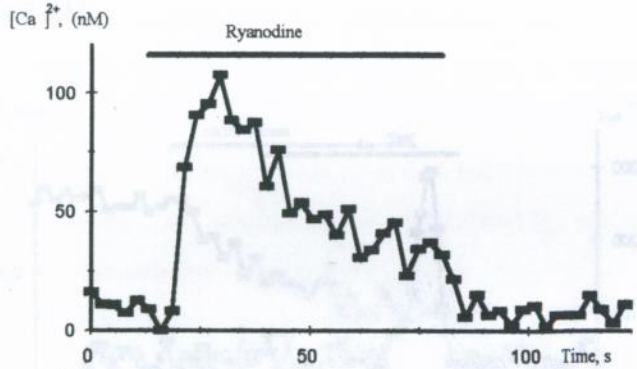
Малюнок 5. Вплив змін концентрацій зовнішього кальцію на концентрацію вільного кальцію в нуклеоплазмі поодинокого ізольованого ядра. Послідовна аплікація високих концентрацій кальцію (1мМ) та ЕГТА (2 мМ) до поодинокого ізольованого ядра. Ядра навантажені Фурою 2-декстраном.



Малюнок 6. Викликаний ІФ3 вихід іонів кальцію в нуклеоплазму. Ядра навантажували кальцієм в присутності АТФ, промивали стандартним розчином без кальцію та АТФ та додавали 10 мкМ ІФ3. Ядра навантажені Фурою 2-декстраном.



Малюнок 7. Викликаний цАДФ-рібозою вихід іонів кальцію в нуклеоплазму. Ядра навантажували кальцієм в присутності АТФ, промивали стандартним розчином без кальцію та АТФ та додавали 10 мкМ цАДФ-рібози. Ядра навантажені Фурою 2-декстраном.



Малюнок 8. Викликаний ріанодином вихід іонів кальцію в нуклеоплазму. Ядра навантажували кальцієм в присутності АТФ, промивали стандартним розчином без кальцію та АТФ та додавали 1 мкМ ріанодину. Ядра навантажені кальцій-Грін 1-декстраном.

вихід був спрямований з оболонки в нуклеоплазму. Такий висновок був зроблений тому, що експерименти проводилися при постійній перфузії ядер стандартним розчином, який мав в своєму складі 100 мкМ ЕГТА. Природа транзієнтів таких ефектів, ймовірно, обумовлена виходом іонів кальцію з нуклеоплазми через комплекс ядерних пор в цитоплазму.

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Об"єднуючи попередні данні (Nicotera, 1989, 1990, 1992) та головні результати нашої роботи відносно транспорту кальцію в ізольованих ядрах ми підтвердили принципові висновки , а саме:

1) АТФ-залежне захоплення кальцію в ізольовані ядра
2) Вихід акумульованого кальцію, викликаний дією ІФ3 .

Нам також вдалося з"ясувати, що цей транспорт кальцію відбувається не в нуклеоплазму або з нуклеоплазми, а в ядерну оболонку або з неї.

Ядерна оболонка є високодинамічною та складною структурою (Simon, 1991, Smith, 1986, Taylor, 1991). Зовнішня мембрана має характеристики ендоплазматичного ретикулуму та відрізняється за своїм білковим складом від внутрішньої мембрани. Простір між зовнішньою та внутрішньою мембранами (люмен ядерної оболонки) є продовженням ендоплазматичного люмену (Alberts, 1989). Наші дослідження не дозволили зробити певний висновок щодо чіткої локалізації Са2+- АТФаз. Вони можуть посідати на внутрішній або зовнішній мембранах ядра (або на обох одночасово), або на продовженні ендоплазматичного ретикулуму ядерної оболонки, який залишається зв"язаним з ядром після процедури ізоляції. Ми показали присутність двох типів кальцієвих каналів на внутрішній ядерній мембрані, демонструючи викликані

концентрації кальцію в інтрануклеоплазмі, що підтверджує спрямованість виходу кальцію у внутрішній ядерний простір. Ми не можемо виключити можливості виходу кальцію з ендоплазматичної мембрани в периферійний простір, який розташований близько біля ядерних пор і є продовженням простору середини ядра. Але не можна не відзначити, що високі локальні концентрації кальцію, які зустрічаються в мікродоменах близько до входу в ІФ3-чутливі канали інтактних клітин (Rizzuto, 1993) залежать від відносно низької мобільности кальцію в цитозолі (Kasai, 1994). Якщо б існували функціональні рецептори ІФ3 на зовнішньому боці ізольованих ядер, які знаходяться в фізіологічному розчині, тоді ми не повинні були б сподіватись на погіршення дифузії кальцію в цитозолі і, таким чином, висока локальна концентрація кальцію є малоймовірною. У наших експериментах присутність 100 мкМ високоафінного кальцієвого хелатора ЕГТА у зовнішньому розчині водночас з швидкою перфузією ядер робило дуже малоймовірним те, що досить високі локальні концентрації кальцію на зовнішньому боці ядра могли б призводити до змін рівнів нуклеоплазматичного кальцію, навіть у присутності ІФ3-чутливих кальцій-визволяючих каналів на зовнішній поверхні. Ланіні та інш. (1992) раніше було запропоновано, що молекули Са2+-АТФази присутні як на зовнішній так і на внутрішній мембранах ядра. Мальвія та інш. (1994) показали за допомогою моноклональних мічених антитіл, що ІФ3-рецептори різних типів розташовані на зовнішній і внутрішній мембранах ядерної оболонки, причому на внутрішній мембрані розташовано приблизно втричі більше ІФ3-рецепторів, що підтверджує наші висновки щодо виходу кальцію, спрямованого в нуклеоплазму. Наші результати чітко засвідчуюит існування кальцієвих насосів, здібних транспортувати кальцій з середовища ядер в люмен ядерної

оболонки та пов"язаний з ним ретикулум.

Наявність рецепторів на внутрішній мембрані ядерної оболонки дозволяє запропонувати існування специфічної системи транспорту кальцію, яка може використовуватися для активації ядерних процесів в клітинах.

Флуоресцентні дослідження на інтактних клітинах показали існування в окремих випадках дуже специфічного субклітинного розподілу кальцій- вивільнюючих каналів (Burgoyne, 1989, Kasai, 1993, Petersen, 1994, Thorn, 1993). Детальне вивчення місць знаходження спеціалізованих субклітинних кальцієвих каналів потребує подальшого вивчення транспорту кальцію у ізольованих клітинних органелах. Дослідження Нікотери та інш., (1990) та Мальвія та інш., (1994) показали, що ізольовані ядра печінки мають ІФ3-чутливі кальцій-вивільнючі канали, а ендоплазматичний ретикулум з клітин печінки щурів має високоафінні місця зв"язування ріанодину. Нещодавно дуже зросла зацікавленність вчених до можливості функції цАДФ-рібози (Lee, 1989) як внутрішньоклітинного посередника, який викликає вихід кальцію. Показано, що цАДФ-рібоза безпосередньо регулює поодинокі канали ріанодинових рецепторів нескелетного типу (Meszaros, 1993). Також нещодавні результати на панкреатичних ацинарних клітинах та нейронах продемонстрували, що цАДФ-рібоза є фізіологічно важливим модулятором ріанодинових рецепторів (Hua, 1994, Thorn, 1994). Результати, представлені в нашій роботі вказують на присутність цАДФ-рібозних та ріанодинових рецепторів в ядерній оболонці. Як цАДФ-рібозні так і ІФ3-рецептори в ядрі можуть робити внесок в формування регулярних кальцієвих хвиль, які розповсюджуються в гепатоцитах у відповідь на стимуляцію агоністів (Thomas, 1991).

ВИСНОВКИ

1. В результаті експериментів на поодиноких ізольованих ядрах з клітин печінки мишей було встановлено, що флуоресцентний кальцієвий індикатор Фура2 розподіляється в ядрах не гомогенно, як вважалось раніше, а зконцентрований в ядерній оболонці. Таке розподілення співпадає з розподіленням флуоресцентного ендоплазматичного маркера ДіОС$_6$(3).

2. Декстран-зв"язані флуоресцентні індикатори кальцій-Грін1-декстран та Фура2-декстран легко проходять через комплекс ядерних пор та накопичуються у нуклеоплазмі.

3. В результаті експериментів з поодинокими ізольованими ядрами, навантаженими декстран-зв"язаними флуоресцентними фарбниками, показано, що ядро проникливе для іонів кальцію. При змінах концентрації вільного цитоплазматичного кальцію відповідно змінюється концентрація вільного кальцію в нуклеоплазмі.

4. Разом з тим ядра накопичують значну кількість іонів кальцію. Показано, що АТФ-залежне захоплення зовнішнього кальцію в поодиноких ізольованих ядрах, направлений не в нуклеоплазму, а в ядерну оболонку.

5.Аплікація інозитол трисфосфата до поодиноких ізольованих ядер викликає зниження концентрації вільного кальцію в ядерній оболонці. Аплікація циклічної АДФ-рібози до поодиноких ізольованих ядер також викликає зниження концентрації вільного кальцію в ядерній оболонці. Таким чином, в ядерній оболонці ядер з клітин печінки розташовані функціональні депо кальцію.

6. Показано, що функціональний вихід іонів кальцію з ядерної оболонки через ІФ3-рецептори спрямований в нуклеоплазму. Також

було показано, що функціональний вихід іонів кальцію з ядерної оболонки через ріанодинові рецептори при стимулюванні циклічною АДФ-рібозою та ріанодином спрямований в нуклеоплазму.

7. Таким чином, ядра мають локальну систему сигналізації, яка складається з функціональних кальцієвих депо, розташованих в ядерній оболонці, звідки кальцій викидається за допомогою інозитол трисфосфату та циклічної АДФ-рібози через відповідні рецептори, збільшуючи тимчасово локальний рівень іонів кальцію в ядрі, що може мати важливе значення для активації кальцій-залежних процесів в ядрі.

Перелік робіт, опублікованих за тематикою дисертації.

Gerasimenko O.V., Gerasimenko J.V., Tepikin A.V., and Petersen O.H. ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca2+ from the nuclear envelope. // Cell , 1995, vol. 80, pp 439-444

Gerasimenko O.V., Gerasimenko J.V., Tepikin A.V., and Petersen O.H. Preferential localization of fura-2 fluorescence in isolated liver nuclei in the perinuclear space // Proceedings of the Physiological society, Liverpool Meeting, 1994, p 76P.

Gerasimenko O.V., Gerasimenko J.V., Belan P.V., and Petersen O.H. Inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca2+ from single isolated pancreatic zymogen granules.// Cell, in press

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

Gerasimenko J.V. Investigation of the Ca2+ transport in isolated liver nuclei.

The dissertation is present in accordance with requirements for the degree of candidate of bioligical sciences in the spatiality 03.00.05 - biophysics. A.A.Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 1996.

Uptake and release of Ca2+ from isolated liver nuclei were studied with fluorescent probes. We shown with the help of digital imaging and confocal microscopy that the Ca2+-sensitive fluorescence is similar to that of an endoplasmic reticulum marker. The previously demonstrated ATP-dependent uptake of Ca2+ into isolated nuclei and release of the accumulated Ca2+ by inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) are therefore due to transport of Ca2+ into and out of the nuclear envelope and not the nucleoplasm. Dextrans labeled with fluorescent Ca2+ indicators (calcium-Green 1 and Fura 2) are distributed uniformly in the nucleoplasm and can be used to show that changes in the external Ca2+ concentration produce rapid changes in the nucleoplasmic Ca2+ concentration. Nevertheless, IP3 and cyclic ADP-ribose evoke transient intranuclear Ca2+ elevations. The release from the Ca2+ stores in or around the nuclear envelope appears to be directed into the nucleoplasm from where it can diffuse out through the permeable nuclear pore complexes.

Герасименко Ю.В. Исследование транспорта ионов кальция в изолированных ядрах из клеток печени мыши.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.05 -биофизика. Институт физиологии им. А.А.Богомольца НАН Украины, Киев, 1996 год.

Целью представленной работы было исследовать транспорт ионов кальция в одиночных изолированных ядрах из клеток печени

мыши с помощью кальций-чувствительных флуоресцентных красителей, используя флуоресцентную и конфокальную микроскопию. Было установлено, что флуоресцентный кальциевый индикатор Фура 2 распределяется в ядрах не гомогенно, а сконцентрирован в ядерной оболочке. Декстран-связанные флуоресцентные индикаторы кальций-Грин-1декстран и Фура2-декстран легко проходят через ядерные поры и накапливаются в нуклеоплазме. В результате экспериментов с одиночными изолированными ядрами, нагруженными декстран-связанными флуоресцентными красителями, показано, что ядро проницаемо для ионов кальция. При изменениях концентрации свободного цитоплазматического кальция соответственно изменяется концентрация свободного кальция в нуклеоплазме. Вместе с тем ядра накапливают значительное количество ионов кальция. Показано, что АТФ-зависимый захват внешнего кальция в одиночных изолированных ядрах, направлен не в нуклеоплазму, а в ядерную оболочку. Апликация инозитол трисфосфата к одиночным изолированным ядрам вызывает снижение концентрации свободного кальция в ядерной оболочке. Апликация циклической АДФ-рибозы к одиночным изолированным ядрам также вызывает снижение концентрации свободного кальция в ядерной оболочке. Таким образом, в ядерной оболочке ядер из клеток печени расположены функциональные депо кальция. Показано, что функциональный выход ионов кальция из ядерной оболочки через ІФ3-рецепторы направлен в нуклеоплазму. Также было показано, что функциональный выход ионов кальция из ядерной оболочки через рианодиновые рецепторы при стимуляции циклической АДФ-рибозой и рианодином направлен в нуклеоплазму. Таким образом, ядра имеют

локальную систему сигнализации, состоящей из функциональных кальциевых депо, расположенных в ядерной оболочке, откуда кальций выбрасывается с помощью инозитол трисфосфата и циклической АДФ-рибозы через соответственные рецепторы, увеличивая временно локальный уровень ионов кальция в ядре, что может иметь важное значения для активации кальций-зависимых процессов в ядре.

Ключові слова: транспорт кальцію, ядро, Фура 2, інозитол 1,4,5-трисфосфат, циклічна АДФ-рібоза.

453125

Ав 33.743