



УДК 576.314

## ДОСЛІДЖЕННЯ ЕЛЕКТРОФІЗІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ НИЗЬКОПОРОГОВИХ КАЛЬЦІЄВИХ КАНАЛІВ ТАЛАМІЧНИХ НЕЙРОНІВ ЩУРА, ЩО ЕКСПРЕСУЮТЬСЯ В ООЦИТАХ *XENOPUS LAEVIS*

Пацева Д.А.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна  
Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАНУ, Київ, Україна

Надійшла до редакції 25.09.2012

Досліджено електрофізіологічні властивості низькопорогових кальцієвих каналів, експресованих у ооцитах *Xenopus Laevis*. Підтверджена можливість використання ооцитів *Xenopus Laevis* в якості тестової моделі для дослідження клонованих низькопорогових кальцієвих каналів.

**Ключові слова:** кальцієві канали Т-типу, ооцити *Xenopus Laevis*.

### ВСТУП

Перебіг багатьох важливих фізіологічних процесів в організмі, таких як опосередкування секреції гормонів і нейромедіаторів, клітинна смерть, процеси диференціації клітин, скорочення м'язів та експресія генів залежить від цитоплазматичної концентрації різних іонів в клітині, одним з основних являється  $\text{Ca}^{2+}$  [1]. Кількість іонів  $\text{Ca}^{2+}$  всередині клітини контролюється великою кількістю клітинних структур; серед них головну роль відіграють кальцієві канали. Кальцієві канали (КК) є трансмембранними структурами, що за певних умов забезпечують вхід іонів кальцію до цитозолу із зовнішньоклітинного середовища. Кальцієві канали поділяються на два основних класи: лігандкеровані та потенціалкеровані. Головною особливістю потенціалзалежних, або потенціалкерованих, кальцієвих каналів (ПККК) є те, що їх функціональний стан визначається величиною мембранного потенціалу [2]. Ці канали забезпечують зв'язок між внутрішньоклітинною концентрацією іонів  $\text{Ca}^{2+}$  зі змінами трансмембранного потенціалу плазматичної мембрани [3]. ПККК діють як зв'язуюча ланка між електричними сигналами, що виникають на поверхневій мембрані, та специфічними функціональними реакціями клітин: секрецією, скороченням, активацією генів тощо [4].

Основними властивостями іонних каналів є вибіркова проникність (селективність) для іонів і здатність відкриватися та закриватися при різноманітних впливах на мембрану (так звана ворітна функція). Молекулярна будова ПККК представлена п'ятьма білковими субодинами: головною -  $\alpha_1$  і допоміжними -  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  [5]. Головною субодинами ПККК є  $\alpha_1$ -субодина, вона несе більшість функціональних якостей каналу, а саме селективність

провідність, чутливість до мембранного потенціалу та блокуючим агентам.

Усі ПККК розподілено на два типи: високопорогові (ВПКК) та низькопорогові (НПКК) кальцієві канали, відповідно до значення граничного потенціалу їх активації [6].

ПККК Т-типу («Т» - від англ. *tiny* та *transient*) відносяться до каналів низькопорогових – тих, у яких активація каналів розвивається при деполяризації трохи вище від значення потенціалу спокою (~ -65 mV). За особливостями молекулярної будови та фармакологічних властивостей КК Т-типу поділяються на  $\text{Ca}_v3.1$ ,  $\text{Ca}_v3.2$ ,  $\text{Ca}_v3.3$  [7, 8]. Канал  $\text{Ca}_v3.1$  сформований  $\alpha_{1G}$  субодинами, він має найбільш швидкий час відновлення після інактивації, локалізується в клітинах мозку, при цьому бере участь у генерації пачок імпульсів у таламокортикальних нейронах і гострокінцевих хвилеподібних розрядів, опосередкованих Б-рецепторами. Канал  $\text{Ca}_v3.2$  сформований субодинами  $\alpha_{1H}$ , має найбільш повільний час відновлення після інактивації, широко розповсюджений у печінці та нирках, а також у серці, в нервовій та ендокринній тканинах. Канали  $\text{Ca}_v3.3$  формуються  $\alpha_{1I}$ -субодинами і генерують Т-струми, що сприяють підтриманню електричної активності нейронів, так як активуються при слабкій деполяризації, близької до величини ПС, локалізуються у нейронах мозку [9,10].

Тема вивчення НПКК є дуже актуальною сьогодні. Детальне дослідження функціонування даних каналів може надати змогу з'ясувати причини багатьох патологій, наприклад, таких, як хвороба Альцгеймера та епілепсія, а також дати можливість знайти нові шляхи для лікування неврологічних, кардіологічних та ендокринних захворювань.

Метою роботи було з'ясувати умови для оптимальної регулярної експресії  $\alpha_{1G}$ -субодинами

низькопорогових кальцієвих каналів таламічних нейронів щура і переконалися, що ооцити *Xenopus laevis* є ефективною моделлю для дослідження клонованих низькопорогових кальцієвих каналів.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

ДНК плазмідна з субклонованою у в pGEM-HEA-векторі  $\alpha 1G$ -субодиницею таламічних нейронів щура (GenBank™/EBI, ідентифікаційний номер AF027984) була люб'язно надана проф. Е. Пересом-Рісом (Університет штату Вірджинія, США). Окрім ділянки, що містила послідовність, яка кодує  $\alpha 1G$ -субодиницю, вектор містить T7 полімеразний промотор, 3' та 5' UTR, а також ген стійкості Afl II до ампіциліну.

Отримання матричної РНК (мРНК) включало певний набір послідовних етапів, внаслідок чого з плазмідної ДНК була отримана мРНК. Були проведенні наступні етапи експерименту: трансформація, електрофорез ДНК, рестрикція, транскрипція, електрофорез РНК.

Частки яєчника самки шпорцевої жаби *Xenopus laevis* попередньо наркотизованої 0.1%-им розчином етиламінобензоату, виділяли оперативним шляхом (Рис. 8) [15], промивали в стерильному сольовому розчині OR2 наступного складу (у мілімолях на 1 л): NaCl 82,5; KCl 2,0; MgCl<sub>2</sub> 1,0; HEPES (5,0 (pH = 7.5) і розділяли на окремі фрагменти. Після промивання фрагменти яєчника ферментативно обробляли у розчині OR-2 із додаванням колагенази 1А типу (2мг/мл) у термостаті при  $t=36^{\circ}\text{C}$  впродовж 40 хв. Після цього зливали розчин ферменту, і промивли клітини 5 разів розчином OR-2 та 3 рази ND-96 (розчин Барта) наступного складу : NaCl (88,0 ммоль/л); KCl (1,0 ммоль/л); NaHCO<sub>3</sub> (2,4 ммоль/л); Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (0,3 ммоль/л); CaCl<sub>2</sub> (0,4 ммоль/л); MgSO<sub>4</sub> (0,82 ммоль/л); HEPES (15,0 ммоль/л) (pH=7,5).

Клітини сортували під біноклярком; неушкоджені ооцити, які знаходились на V-VI стадіях розвитку, відбирали і інкубували при  $t=18^{\circ}\text{C}$  на протязі 1 доби перед ін'єкцією. Після проходження 1 доби ооцити ін'єктували отриманою мРНК та інкубували на протязі 3-4 діб. Ооцити у розчині Барта придатні для експерименту протягом 5-7 діб.

Для реєстрації струму та побудови вольт-амперної характеристики експресованих каналів використовували метод двомікроелектродної фіксації потенціалу

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

**Отримання мРНК.** За допомогою гел'електрофорезу ми тестували ДНК, яку було отримано після трансформації *E. coli* та рестрикції виділеної накопиченої пДНК. Результати гел'електрофорезу отриманої ДНК представлено на рис. 1. Як свідчать дані візуалізації зразків ДНК, згідно показникам електрофорезу леддера смуга лінеаризованої ДНК відповідає значенню 7 kb, як і очікувалося.

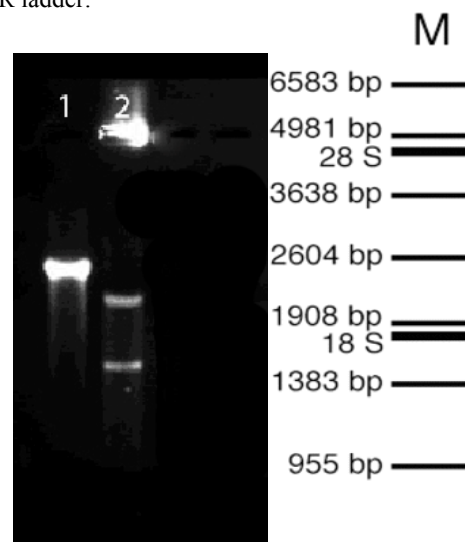
Отримані дані ДНК фореу свідчать про те що трансформація пройшла успішно, і накопичений

плазмідний матеріал є набором генів, що кодують  $\alpha 1G$ -субодиницю таламічних нейронів.



**Рис. 1.** Фото, отримане в УФ-камері для візуалізації результатів ДНК-фореу:

1 - ДНК з послідовністю, що кодує нормальну  $\alpha 1G$ -субодиницю після рестрикції  
2 - пДНК, що кодує послідовність нормальної  $\alpha 1G$ -субодиниці  
M - ДНК ladder.



**Рис. 2.** Фото, отримане в УФ-камері для візуалізації результатів РНК-фореу:

1-мРНК, що кодує послідовність нормальної  $\alpha 1G$ -субодиниці,  
2-тотальна мРНК, виділена з таламічних нейронів щура.

Гель-електрофорез було також використано для тестування мРНК, що була отримана в результаті транскрипції лінеаризованої плазмідної ДНК  $\alpha 1G$ -субодиниці НПКК таламічних нейронів щурів. В якості ледера було використано тотальну РНК, виділену з таламічних нейронів щура. Відомо, що тотальна РНК при проведенні електрофорезу розділяється на дві смуги, які відповідаються значенням [21]. Результати електрофорезу мРНК представлені на рис. 2. Візуалізація результатів РНК-фореу свідчать про те, що отримана мРНК є ідентичною мРНК, що кодує  $\alpha 1G$ -субодиницю і може бути використана для ін'єкції в ооцити з метою отримання функціональної експресії НПКК.

Результати двомікроелектродної фіксації потенціалу. Ооцити *Xenopus laevis* є зручною тест-

системою для дослідження експресії генів у біофізиці, фізіології, молекулярній біології. Введення ДНК або мРНК в оцит дозволяє вивчити їх білкові продукти (в даному експерименті – низькопорогові кальцієві канали, що експресуються). Через незначну експресію в цих клітинах ендогенних потенціалзалежних іонних каналів, вони активно використовуються при дослідженні експресії та властивостей потенціалкерованих кальцієвих каналів. Інжекція в оцити *Xenopus laevis* транскрибованої *in vitro* мРНК до  $\alpha$ G1 призводила до значної експресії низькопорогових каналів через 4-5 днів після введення мРНК.

Під час виконання експерименту у якості контролю були використані неінжектвані оцити *Xenopus laevis*, які не містили мРНК, і були поміщені в розчин  $Ba$  10мМ. Використовуючи методику двомікроелектродної фіксації потенціалу, було встановлено, що оцити не мають власного кальцієвого струму, і фіксувались лише ендогенні кальцій-залежні  $Ca^{2+}$  струми. Під час проведення експерименту в підготовлені згідно наведеної методики оцити *Xenopus laevis* було інжектвано мРНК, що відповідає за експресію  $Ca_v3.1$  клонованого НПКК. Після інкубації інжектованих оцитів на протязі 4-5 діб, безпосередньо перед проведенням електрофізіологічних досліджень, у клітини додатково інжектували буфер ВАРТА. Як відомо, даний буфер використовується для усунення  $Ca$ -залежних  $Ca^{2+}$  струмів, які вносять шуми при реєстрації струмів через T-канали. При реєстрації інтегральних струмів через низько порогові канали

використовували в якості носія заряду іони барію. Отримали оригінальний запис струмів  $Ba^{2+}$  току через НПКК  $Ca^{2+}$  канали. Після оброблення отриманих результатів струму побудували вольт амперні характеристики струмів, нормованих до максимального значення кальцієвого струму.

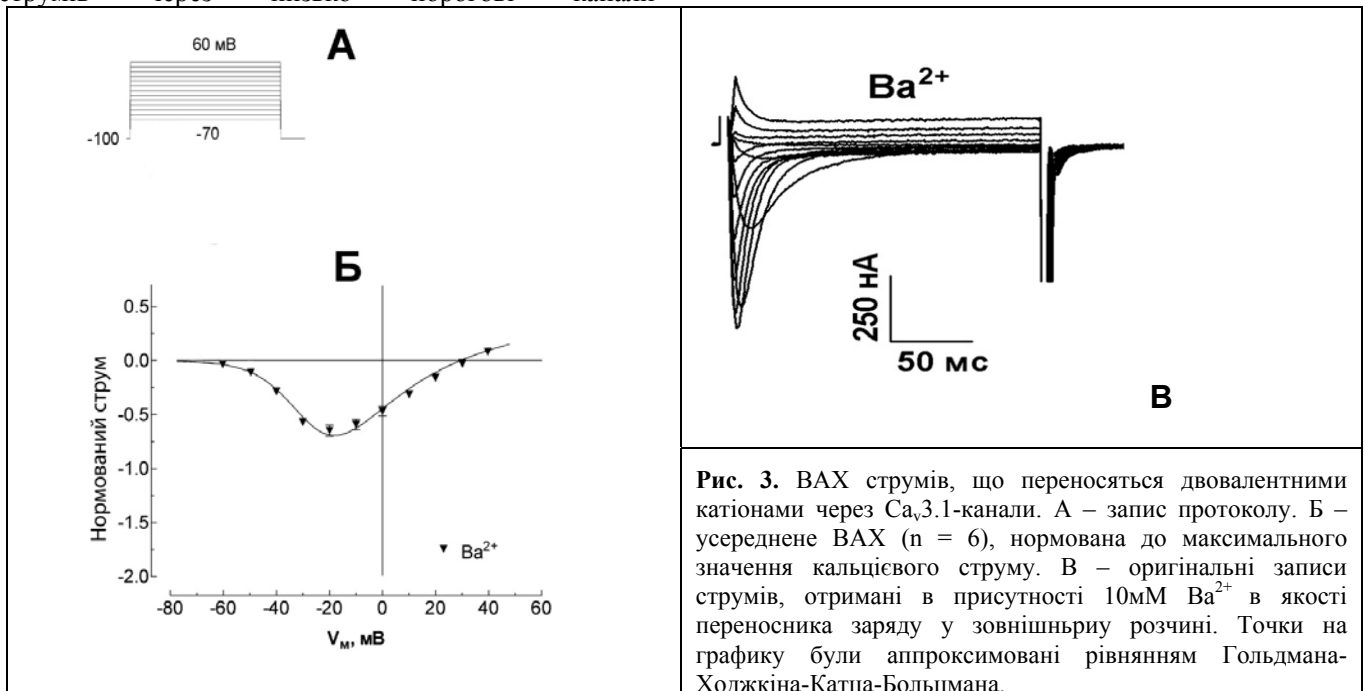
Компенсацію струмів витоку та початкову обробку отриманих під час експерименту результатів було проведено за допомогою програмного забезпечення Clampfit 8.0 (“Axon Instruments”, США).

Для побудови графіків вольт амперної характеристики струмів та для їх апроксимації була використана програма Origin 7.5 (“OriginLab Corporation”, США).

Дані на ВАХ апроксимувались рівнянням Гольдмана-Ходжкіна-Катца-Больцмана:

$$I = P_s z_s^2 \frac{VF^2}{RT} \frac{[S]_i - [S]_o \exp(-z_s FV/RT)}{1 - \exp(-z_s FV/RT)} \times \frac{1}{(1 + \exp \frac{V - V_{1/2}}{k})}$$

де  $P_s$  – коефіцієнт абсолютної проникності (сантиметри в секунду);  $z$  – валентність тестованого катіона  $Ba$  ( $S$ ),  $[S]_i$  і  $[S]_o$  – відповідно їх внутрішня і зовнішня концентрації,  $I$  – нормоване пікове значення амплітуди струму при підтримуючому на мембрані потенціалі –  $V$ ,  $R$  – газова стала,  $T$  – абсолютна температура,  $F$  – константа Фарадея (при кімнатній температурі 25°C,  $RT/F$  дорівнювала 25.7),  $V_{1/2}$  – потенціал половини активації та  $k$  – коефіцієнт нахилу.



**Рис. 3.** ВАХ струмів, що переносяться двовалентними катіонами через  $Ca_v3.1$ -канали. А – запис протоколу. Б – усереднене ВАХ ( $n = 6$ ), нормована до максимального значення кальцієвого струму. В – оригінальні записи струмів, отримані в присутності 10мМ  $Ba^{2+}$  в якості переносника заряду у зовнішньому розчині. Точки на графіку були апроксимовані рівнянням Гольдмана-Ходжкіна-Катца-Больцмана.

Завдяки отриманим записам змогли переконатись, що ми зареєстрували саме кальцієві струми T-типу.

Ознакою того, за якою ми визначили, що данні струми є саме НПКК, є залежність форми вольт-амперної характеристики, що ми вимірювали за максимальним значенням барієвого струму у

відповідь на ступінчасту деполяризацію, від величини потенціалу на мембрані. Для порівняння та підтвердження того, що отримані струми є саме  $Ba$ -струмами, що протікають через низькопорогові кальцієві канали, були використані оригінальні записи

струмів та їх вольт-амперні характеристики із відомих даних.

Дані реєстрації оригінальних записів струму та характер вольт-амперної характеристики (ВАХ) дають підстави зробити висновок, що в ході проведеного експерименту при використанні рGEM-HEA-вектору було досягнуто функціональну експресію Ca<sub>v</sub>3.1 кальцієвих каналів таламічних нейронів щура. Висновки

## ВИСНОВКИ

Використання обраних методів молекулярної біології дозволило отримати функціональну експресію  $\alpha 1G$ -субодиниці низькопорогових кальцієвих каналів таламічних нейронів щура. Завдяки використанню двоелектродної фіксації мембранного потенціалу були зареєстровані інтегральні струми та побудовані вольт амперні характеристики. Аналіз зареєстрованих інтегральних струмів та характер побудованих ВАХ дав підстави вважати, що експресовані канали належать до родини низькопорогових кальцієвих каналів Т-типу. Ооцити *Xenopus Laevis* є ефективною моделлю для дослідження клонуваних низькопорогових кальцієвих каналів. В подальших дослідженнях ми намагатимемося з'ясувати, чи придатна данна система до фармакологічних досліджень.

## Література

1. Я.М. Шуба. Основи молекулярної фізіології іонних каналів. – К.: Наук. Думка, 2010. – 448 с.
2. Perez-Reyes E. Molecular Physiology of Low-Voltage-Activated T-type Calcium Channels.// *Physiol Rev.* 83: 117–161, 2003.
3. Nilius B., K. Talavera, A. Verkhratsky. T-type calcium channels: The never ending story.// *Cell Calcium* 40 (2006) 81–88.
4. P. Kostyuk, E. Lukanetz, Ya. Shuba. Molecular physiology and pharmacology of the calcium channels // *Нейрофізіологія.* — 2002. — 34, N 2-3. — С. 117-120.
5. Lacinova L. Voltage-dependent calcium channels.// *Gen Physiol Biophys.* 2005 Jun; 24 Suppl 1:1-78.
6. Talavera K., B. Nilius. Biophysics and structure–function relationship of T-type Ca<sup>2+</sup> channels.// *Cell Calcium* 40- (2006) - 97–114.
7. А.К. Щегловитов, Я.М. Шуба Натрий-кальциевая избирательность клонированных кальциевых каналов Т-типа // *Нейрофизиология.* – 2006. – 38, N 3. – С. 183-192
8. А.К. Щегловитов, А.И. Болдырев, О.П. Любанова, Я.М. Шуба Особенности селективности трех подтипов клонированных кальциевых каналов Т-типа // *Нейрофизиология.* – 2005. – 37, N 4. – С. 319-329.
9. С.В.Романенко, П.Г.Костюк, О.П.Костюк. Транс-мембранна кальцієва сигналізація – роль у ноцицепції.// *Журн. АМН України.* – 2008. – Т. 14, №1. - С. 3-25.
10. Мельников К.Н. Разнообразие и свойства кальциевых каналов возбудимых мембран.// *Психофармакол. биол. наркол.* – 2006. – Т. 6, № 1–2. – С. 1139–1155.

---

## RESEARCH ELECTROPHYSIOLOGICAL PROPERTIES OF LOW-CALCIUM CHANNELS IN THALAMIC NEURONS OF RATWHAT EXPRESSED IN OOCYTES *XENOPUS LAEVIS*

Patseva D.A.

The electrophysiological properties of low-threshold calcium channels expressed in oocytes of *Xenopus Laevis* were studied. The use of oocytes *Xenopus Laevis* as a test model for the study of cloned low-threshold calcium channels was proven.

**Keywords:** calcium channels, T-type oocytes *Xenopus Laevis*.

---

## ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НИЗКОПОРОГОВЫХ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ ТАЛАМИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ КРЫСЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХСЯ В ООЦИТАХ *XENOPUS LAEVIS*

Пацева Д.А.

Исследованы электрофизиологические свойства низькопорогових кальциевых каналов, экспрессированных в ооцитах *Xenopus Laevis*. Показана принципиальная возможность использования ооцитов *Xenopus Laevis* в качестве тестовой модели для исследования клонированных низькопорогових кальциевых каналов.

**Ключевые слова:** кальциевые каналы Т-типа, ооциты *Xenopus Laevis*.

---