

УДК 577.352.5

© Колектив авторів, 2012.

ЗОВНІШНЬОКЛІТИННА НІКЕЛЬ-ЗВ'ЯЗУЮЧА ДІЛЯНКА ПЕТЛІ IS3-IS4 КОНТРОЛЮЄ СЕЛЕКТИВНІСТЬ КАЛЬЦІЄВИХ КАНАЛІВ Т-ТИПУ

О.В. Носаль^{1,3}, О.П. Любанова^{1,3}, В.Г. Найденов², Я.М. Шуба^{1,2,3}

¹ Міжнародний центр молекулярної фізіології НАН України, м. Київ; ² Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, м. Київ; ³ Державна ключова лабораторія молекулярної і клітинної біології, м.Київ.

NI²⁺-BINDING DOMAIN OF EXTRACELLULAR IS3-IS4 LOOP OF T-TYPE CA-CHANNELS CONTROLS CHANNEL'S SELECTIVITY

O.V. Nosal, O.P. Liubanova, V.G. Naidenov, Y.M. Shuba

SUMMARY

In the present study we compared selectivity of the wild-type (w/t), weakly sensitive to the blockade by Ni²⁺ Cav3.1 T-channel isoform with Cav3.1-mutant, in which glutamine (Q) in the position equivalent to the H191 of Cav3.2 was substituted by histidine (Q172H mutant) making it more Ni²⁺ sensitive. Our results suggest that the presence of histidine-191 (H191) in the extracellular IS3-IS4 loop of T-channels not only determines the affinity of channel blockade by Ni²⁺, but also modifies its selectivity.

ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ НИКЕЛЬ-СВЯЗЫВАЮЩИЙ УЧАСТОК ПЕТЛИ IS3-IS4 КОНТРОЛИРУЕТ СЕЛЕКТИВНОСТЬ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ Т-ТИПА

Е.В. Носаль, О.П. Любанова, В.Г. Найденов, Я.М. Шуба

РЕЗЮМЕ

В данной работе мы провели сравнительный анализ селективностей канала дикого типа Cav3.1 со слабой чувствительностью к действию никеля с каналом-мутантом (Q172H), у которого глутамин (Q) был заменен гистидином в эквивалентной позиции к гистидину (H191) Cav3.2-канала, обуславливая увеличение чувствительности канала к никелю. Наши результаты указывают на то, что гистидин-191 (H191) во внеклеточной IS3-IS4 петле Т-каналов не только определяет их чувствительность к действию никеля, но также модулирует их селективность.

Ключові слова: Т-тип кальцієвих каналів, ооцити *Xenopus*, селективність.

Мембрани усіх збудливих та багатьох незбудливих клітин характеризуються наявністю потенціалозалежних кальцієвих каналів (ПЗКК), що утворюють цілу родину, яка поділяється на два великі класи: високопорогові (ВПКК) і низькопорогові кальцієві канали (НПКК), базуючись на різниці в їх електрофізіологічних і фармакологічних властивостях. Їх активація опосередковує вхід кальцію всередину клітини, що в свою чергу запускає і регулює різноманітні фізіологічні процеси [1]. ПЗКК є високоселективними структурами: ефективно пропускаючи одні іони, вони, в той же час, блокують проходження інших. Вважається, що селективність ПЗКК контролюється їх селективним фільтром - найвужчою ділянкою відкритої пори, утвореною амінокислотними залишками, що специфічно взаємодіють з проникаючими іонами. В попередні десятиліття було досягнуто значного прогресу у з'ясуванні ключових елементів в структурі пори ПЗКК, які здатні впливати на їх проникність і селективність. Так, за допомогою введення направлених точкових мутацій було показано, що у ВПКК такими ключовими елементами є 4 залишки глутамату (EEEE-локус) [9], а у НПКК – два залишки глутамату і два аспартату (EEDD-локус), що знаходяться в Р-ділянках I-IV доменів $\alpha 1$ -субодиниці. Подальші дослідження довели, що заміна аспартатів

на глутамати в Ca_v3.1-каналі лише частково відтворювала проникність, характерну для ВПКК [8], що вказало на наявність в структурі кальцієвих каналів інших елементів, окрім EEEE- чи EEDD-локусів, що регулюють їх селективність і проникність.

Клонування трьох основних пороформуючих $\alpha 1$ -субодиниць НПКК, дозволило ідентифікувати три підтипи вказаних каналів: Ca_v3.1, Ca_v3.2, Ca_v3.3. Згодом, в структурі найбільш чутливого до дії іонів нікелю представника НПКК – Ca_v3.2-каналу було ідентифіковане позаклітинне місце зв'язування для цього катіона, що сформоване амінокислотами IS3-IS4 ділянки з визначальним молекулярним елементом – гістидином, що знаходиться в 191 позиції (H191) [3]. На сьогодні питання про роль цього місця зв'язування в контролі селективності НПКК залишається відкритим.

Тому метою нашого дослідження стало проведення порівняльного аналізу селективностей Ca_v3.1- каналу дикого типу з його каналом-мутантом Q172H, у якого глутамін (Q) в еквівалентній позиції до H191 Ca_v3.2-каналу був замінений гістидином.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Досліди проводили на ооцитах *Xenopus laevis*, що експресували Ca_v3.1- канал дикого типу та його мутант – Q172H-канал, струми через які реєстрували

за допомогою стандартної методики двохелектродної фіксації потенціалу на четвертий – сьомий день після ін'єкції мРНК, що відповідає за синтез цих каналів, з використанням підсилювача TEV-200A (“Dagan Corp.”, США), аналогово-цифрового перетворювача Digidata 1200A (“Axon Instruments”, США) персонального комп'ютера та програмного забезпечення Clampex 8.0 (“Axon Instruments”, США). Потенціальний електрод мав опір 1-2 МОм, а струмовий – 0.5-1 МОм. Обидва мікроелектроди заповнювали розчином KCl (3.0 М). Для пригнічення ендогенної кальційзалежної хлорної провідності, за 1-4 год. до початку експерименту в ооцит вводили 50 нл буферного розчину ВАРТА (20 мМ; рН 7.4 встановлювався за допомогою КОН). Струми через експресовані кальцієві канали вимірювали в розчині, що містив в якості переносника заряду Ca^{2+} , Sr^{2+} чи Ba^{2+} , склад розчину був таким (ммоль/л): CaCl_2 (або BaCl_2 або SrCl_2) – 10.0, TEA-Cl – 107.5, HEPES – 5.0 (рН 7.4 встановлювався за допомогою TEA-OH). Всі реактиви, які використовували для приготування розчинів були від фірми “Sigma”, (США).

Відносні провідності (G_x/G_{Ca}) розраховували як відношення максимальних пікових значень амплітуд вхідних струмів, що переносяться тими або іншими іонами (X), до максимального пікового значення, що спостерігається при використанні Ca^{2+} в якості переносника заряду ($G_x/G_{\text{Ca}} = I_{x(\text{макс})}/I_{\text{Ca}(\text{макс})}$). Відносні проникності (P_x/P_{Ca}) розраховувались за допомогою модифікованого рівняння Гольдмана – Ходжкіна – Каца [2]:

$$\frac{P_x}{P_{\text{Ca}}} = \frac{[\text{Ca}]}{[\text{X}]} \exp\left(\frac{ZF\Delta E}{RT}\right)$$

де $\Delta E = E_x - E_{\text{Ca}}$, - різниця потенціалів нульового струму для тестованого двовалентного катіона X і Ca^{2+} відповідно, [Ca] і [X]- концентрації цих іонів, Z- валентність катіонів, які тестуються, R- газова стала, T- абсолютна температура і F- константа Фарадея (при кімнатній температурі 25 °C RT/F дорівнювала 25.7).

Обробку та аналіз результатів проводили за допомогою програмного забезпечення Clampfit 9.0 (“Axon Instruments”, США) та OriginPro 8 (“OriginLab Corp.”, США). Для визначення статистичної достовірності результатів використовували t-тест Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ І ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ін'єкція в ооцити *Xenopus* мРНК, що кодує $\text{Ca}_v3.1$ - або Q172H-канал, призводила до експресії цих каналів з властивими для них характеристиками, зокрема, як було описано [3], струми через Q172H-канали були набагато чутливішими до дії іонів нікелю, ніж струми через $\text{Ca}_v3.1$ -канали.

На рис.1, А-Б наведені записи інтегральних

струмів через кожен з каналів при використанні в якості переносників заряду різних двовалентних катіонів. Видно, що амплітуди кальцієвого, стронцієвого та барієвого струмів різняться для $\text{Ca}_v3.1$ -каналу: $I_{\text{Sr}} \gg I_{\text{Ca}} > I_{\text{Ba}}$, що узгоджується з результатами [4], для цього каналу ($I_{\text{Ca}} > I_{\text{Ba}}$), водночас для Q172H-каналу вони виявились практично однаковими: $I_{\text{Sr}} \gg I_{\text{Ca}} \gg I_{\text{Ba}}$.

Співвідношення відносних змін амплітуд інтегральних струмів (нормованих відносно максимального значення амплітуди кальцієвого струму) через $\text{Ca}_v3.1$ -канали були такими: $I_{\text{Sr}}:I_{\text{Ca}}:I_{\text{Ba}} = 1.03:1:0.7$, в той час як аналогічні послідовності для Q172H-каналу мали наступний вигляд: $I_{\text{Sr}}:I_{\text{Ca}}:I_{\text{Ba}} = 0.98:1:0.103$ (рис.2), тобто заміна глутаміну в $\text{Ca}_v3.1$ -каналі дикого типу на гістидин в еквівалентній позиції до H191 $\text{Ca}_v3.2$ -каналу призводила до появи однакової провідності отриманої “химери” для Ca^{2+} , Sr^{2+} та Ba^{2+} , що відрізняється від описаних раніше провідностей, характерних як для $\text{Ca}_v3.1$ - так і $\text{Ca}_v3.2$ -каналу [6].

Співвідношення відносних проникностей для різних двовалентних катіонів для $\text{Ca}_v3.1$ -каналу мали вигляд: $P_{\text{Ca}} > P_{\text{Ba}} > P_{\text{Sr}} = 1:0.96:0.9$; а для Q172H-каналу: $P_{\text{Sr}} > P_{\text{Ba}} > P_{\text{Ca}} = 1.11:1.06:1$ (рис.2). Виходячи з того, що відносні проникності характеризують висоту енергетичних бар'єрів, що складають енергетичні профілі каналу для двох тестових катіонів [5], такі результати можуть вказувати на приблизно однакову їх висоту у обох досліджуваних каналах.

Окрім того, зважаючи на той факт, що $\text{Ca}_v3.1$ - та Q172H-канали демонструють майже однакові відносні проникності, різницю у величинах макроскопічних Ca^{2+} , Sr^{2+} та Ba^{2+} -струмах в каналах дикого типу можна пояснити відмінностями у впливі проникаючого іона на ймовірність відкриття (P_0) даних каналів, тобто воротні процеси [7]. Слід також зазначити, що у $\text{Ca}_v3.1$ -каналів найбільший вплив спостерігається при використанні Sr^{2+} , далі Ca^{2+} і Ba^{2+} . Водночас, найбільш імовірно, що у Q172H-каналі відбувається уніфікація цього впливу для різних катіонів, обумовлена появою нового елемента в структурі каналу.

ВИСНОВКИ

Підсумовуючи вищевикладене, слід зазначити, що наявність гістидину-191 (H-191) в зовнішньоклітинній IS3-IS4 ділянці T-каналів не тільки визначає ступінь блоку каналу нікелем, але також модулює їх селективність.

ЛІТЕРАТУРА

1. Catterall W. A. Voltage-gated calcium channels/ W. A. Catterall // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. – 2011.– Vol. 3(8). – P. a003947
2. Hille B. “Selective permeability: independence” in Ion channels of excitable membranes/ B. Hille, Sunderland: Sinn. Ass. Inc., 1992.– 607 P.
3. Kang H. W. A molecular determinant of nickel inhibition in $\text{Ca}_v3.2$ T-type calcium channels / H. W.

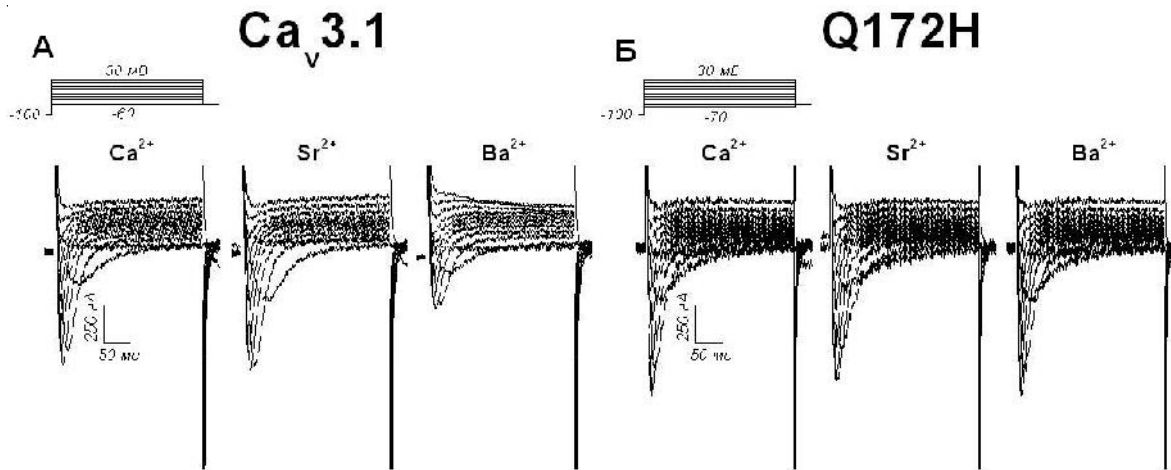


Рис. 1. Оригінальні записи струмів через Cav3.1- (А) та Q172H-канали (Б), викликаних прикладанням деполяризаційних імпульсів (форма протоколу показана вгорі), при використанні 10 мМ Ca^{2+} , 10 мМ Sr^{2+} , і 10 мМ Ba^{2+} в якості переносників заряду.

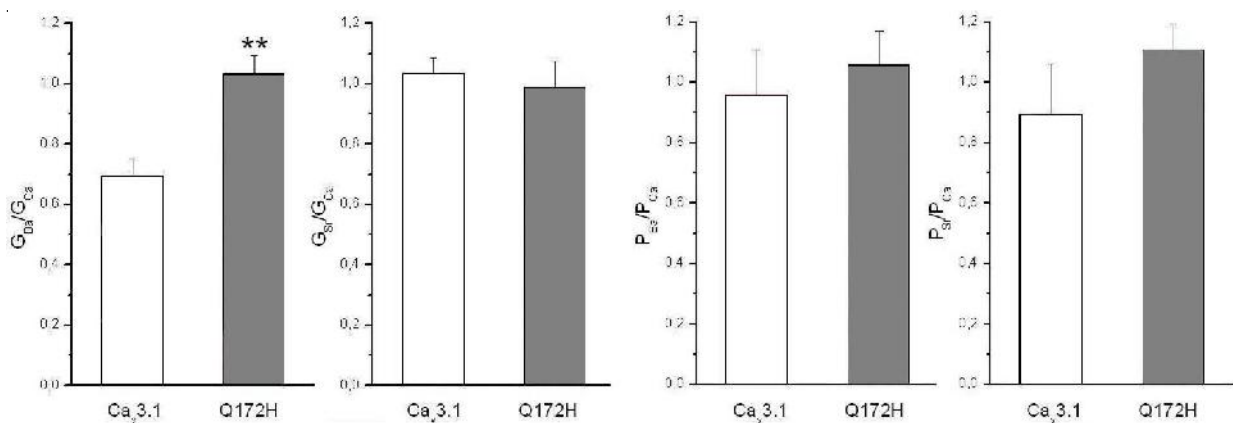


Рис. 2. Відносні провідності та проникності Cav3.1- та Q172H-каналу (n=5-10). Дані представлені як середнє \pm похибка середнього, **p<0.01.

Kang, J. Y.Park, S. W. Jeong, J. A Kim., H. J.Moon, E. Perez-Reyes, J. H. Lee // J. Biol. Chem.–2006.– Vol. 281.– P. 4823-4830.

4. McRory J. E. Molecular and functional characterization of a family of rat brain T-type calcium channels // J. E. McRory, C. M. Santi, K. S. Hamming, J. Mezeyova, K. G. Sutton, D. L. Baillie, A. Stea, T. P. Snutch // J. Biol. Chem.–2001.– Vol. 276.– P. 3999-4011.

5. Sather W.A., McCleskey E.W. Permeation and selectivity in calcium channels / W.A. Sather, E.W. McCleskey // Annu. Rev. Physiol.–2003.– Vol. 65.–P. 133-59.

6. Shcheglovitov A. Selectivity signatures of three isoforms of recombinant T-type Ca^{2+} channels / A. Shcheglovitov, P. Kostyuk, Y. Shuba // Biochim. Biophys. Acta.–2007.– Vol.176.– P.1406-19.

7. Shuba Y.M. The effect of permeant ions on single calcium channel activation in mouse neuroblastoma cells: ion-channel interaction/ Y. M. Shuba, V. I. Teslenko, A. N. Savchenko, N. H. Pogorelaya // J. Physiol. (Lond.) – 1991.– Vol. 443.– P. 25-44.

8. Talavera K. Aspartate residues of the Glu-Glu-Asp-Asp (EEDD) pore locus control selectivity and permeation of the T-type Ca^{2+} channel $\delta 1\text{G}$ / K. Talavera, M. Staes, A. Janssens, N. Klugbauer, G. Droogmans, F. Hoffmann, B. Nilius // J. Biol. Chem.–2001.– Vol. 276.– No49.– P. 45628-45635.

9. Yang J. Molecular determinants of Ca^{2+} selectivity and ion permeation in L-type Ca^{2+} channels/ J. Yang, P.T. Ellinor, W. A. Sather, J. F. Zhang, R.W. Tsien // Nature.– 1993.– V. 366.– P.158-161.