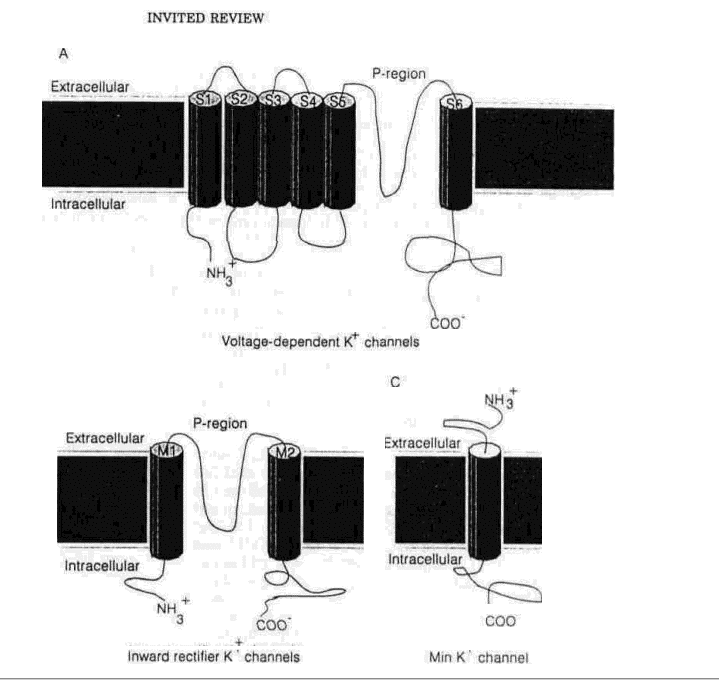
***МЕХАНІЗМИ ІНАКТИВАЦІЇ ПОТЕНЦІАЛ-ЗАЛЕЖНИХ К+ КАНАЛІВ***

Вступ.

При деполяризації мембрани багато потенціал-залежних йонних каналів, особливо деякі К+ канали переходять в довготривалий стан непровідності, чи інактивації. В результаті цього істотно змінюється транзієнтна проникність мембрани для калію, не зважаючи на тривалу і сильну деполяризацію. Така властивість деяких К+ каналів дозволяє дуже тонко регулювати палітру активності збудливих клітин через різну частоту потенціалів дії. Тому, вочевидь, дуже важливо для біологів та біомембранологів розуміти молекулярні механізми, які викликають інактивацію К+ каналів та можливі способи фізіологічної регуляції цього процесу.

Інактивація К+ каналів



На відміну від гомогенної інактиваційної поведінки потенціал-залежних Na+ каналів, потенціал-залежні К+ канали, досліджені в їхньому природному середовищі, показують широку різноманітність інактиваційних часових інтервалів. Інактивація цих каналів спостерігається в діапазоні від кількох мілісекунд – швидка інактивація (як у А-струму, описаного в нейронах молюсків) до майже помітного процесу тривалістю кілька тисяч мілісекунд, (як у випадку струму затриманого випрямлення в гігантському аксоні кальмара). Така різноманітність також спостерігається в дослідах з клонованими К+ каналами, експресованими в гетерогенному середовищі. Наприклад, *ShakerB* канал інактивується з часовою константою 1-3 мс, тоді як відповідний канал drk1 демонструє значно повільнішу інактивацію. Так само, К+ канали, клоновані з мозку ссавців, показують дуже відмінні інактиваційні інтервали. В деяких випадках неструктурні білки, що утворюють minК+ канали (мал.1) не піддаються інактивації навіть після деполяризаційних імпульсів тривалістю кілька секунд. Ця різноманітність інактиваційних інтервалів навіть між дуже близькими між собою продуктами генів допомогла краще зрозуміти механізми інактивації К+ каналів.

NH2 – кінцевий домен як інактиваційної частинки.

Відомо, що *Shaker* канали - це родина різних, але близько споріднених білків, які кодуються транскриптами альтернативного сплайсингу. Існує 5 альтернативно сплайсованих NH2 – кінцевих варіантів *Shaker*  і 2 СООН – кінцевих. Після того, як вдалося встановити продукт *Shaker* локусу дрозофіли, дослідники припустили, що альтернативні транскрипти одного й того ж самого локусу індукують експресію К+ каналів з різною інактиваційною поведінкою.

Таким чином, наприклад, струм через *ShakerА2 –* канал, який відрізняється від *ShakerD2* лише своїм NH2 – кінцевим доменом, на 90% інактивується протягом кількох мілісекунд, тоді як струм через *ShakerD2* канал інактивується лише на 15% і значно повільніше.

Iverson and Rudy створювали конструкції з різними комбінаціями NH2 – та СООН – кінцевих варіантів *Shaker* і помітили виникнення як інактиваційних, так і неінактиваційних струмів після їхньої експресії. Помічена різниця може бути віднесена на рахунок присутності саме NH2 – кінцевих доменів в кожній конструкції. Ці результати дозволили твердити про те, що структури, розташовані на NH2– кінці (можливо це цитоплазматичні домени) можуть бути задіяні в інактиваційному процесі.

Працюючи з *ShakerВ* каналами Hoshi та ін. простежили, що обробка трипсином внутрішнього боку збудливої мембрани катастрофічно сповільнює інактивацію ізольованих каналів, не впливаючи на процеси активації та проникності. Ці дані узгоджуються з припущенням про участь цитоплазматичного домену в процесі інактивації і через це вчені зосередили свою увагу на аналізі амінокислотної послідовності кінцевого NH2 домену *ShakerВ* білку. Hoshi та співробітники робили систематичні делеції амінокислот і встановили, що делеції, які включають перші 22 амінокислоти змінюють швидкий інактиваційний процес на зразок як це робить трипсин. Такі делеції збільшують середній час, протягом якого канали перебувають у відкритому стані, збільшують кількість відкритих протягом серії каналів та зменшують тривалість інтервалів між серіями. Ці дані відповідають результатам про сповільнення інактивації макроскопічних струмів. Делеції поза ділянкою перших 22 амінокислот не порушують інактивацію, але зменшують середню тривалість відкритості каналів пропорційно до довжини делетованої ділянки. Ці спостереження доводять роль перших 22 амінокислот як інактиваційної “кульки”, а решти NH2 кінцевого домену як “ланцюжка”, що сполучає кульку з каналом.

Прогноз про те, що, виходячи з моделі “кульки і ланцюжка” додавання ізольованих кульок до цитоплазматичного боку каналів, не здатних до інактивації відновить цю їхню здатність підтвердився експериментами Zagotta et al. В цих експериментах рівень відновленої каналами інактивації залежав від концентрації доданого кулькового пептиду. Ефект дії пептиду виявився зворотнім і не спостерігався при попередній обробці пептиду трипсином.

*ShakerВ* інактиваційна кулька має первинну структуру, що містить 11 гідрофобних або незаряджених залишків та наступну групу з восьми сильно полярних амінокислот. Aldrich та співробітники більш детально дослідили внесок в інактивацію кожної частини кулькового домену. Вони зробили серії селективних мутацій і довели важливість як гідрофобної, так і зарядженої частини домену для процесу інактивації. Модель *ShakerВ* інактиваційної кульки може бути застосована і до інших типів потенціал-залежнних каналів. Наприклад, було показано, що делеція перших 25 амінокислот NH2 кінцевого домену серцевих К+ каналів щурів призводить до значного зниження швидкої інактивації. Також делеція NH2 кінцевого домену (амінокислот 1-110) RCK4 призводить до експресії повільно інактивованого струму, на відміну від А-типу струму, який виникає внаслідок екпресії RCK4 транскрипту повної довжини. Найбільш визначним є той факт, що *ShakerВ* кульковий пептид також має здатність блокувати (інактивувати?) еволюційно більш віддалені К+ канали. Було показано, що інші потенціал-залежні Са-активовані калієві канали, і ц-АМФ-залежні канали блокуються *ShakerВ* кульковим пептидом, якщо його додавати внутрішньоклітинно. Ці спостереження особливо помітні через те, що такі канали за нормальних умов не виявляють інактивації. Дані, отримані з *Shaker* К+ каналами так само як і з maxi К+ струмами пролили світло на тонкі процеси взаємодії між інактиваційною кулькою та каналом.

Взаємодія кулькового пептиду та рецептора.

Ідея про те, що як гідрофобний так і заряджений кінець кульки роблять свій внесок у взаємодію між кульковим пептидом і рецептором більш інтенсивно досліджувалась шляхом спострежння ефекту мутантних пептидів на інактивацію *ShakerВ* і maxi К+. В обох випадках було продемонстровано, що зміна загального заряду кульки (внаслідок мутації амінокислот в СООН ділянці) впливає на рівень інактивації як макроструму так і струму через ізольовані окремі канали. Цікаво, що ці зміни заряду пептиду модулюють лише рівень включення інактивації, в той час як рівень виключення інактивації залишається в основному незмінним. Таким чином, збільшення позитивного заряду кульки підвищує рівень включення, і навпаки, зниження позитивного заряду або підвищення негативного зменшує рівень включення інактивації. Ці ефекти електричного заряду максимальні в умовах низької іонної сили і мінімальні при високих сольових концентраціях. Всі разом ці результати було інтерпретовано з точки зору різноманітних елктростатичних взаємодій між позитивно зарядженою кулькою і негативно зарядженою поверхнею в, або поблизу внутрішнього гирла каналу. Електростатичний потенціал, індукований цими негативними зарядами буде спрямовувати кульку до її рецептора. З іншого боку заміна гідрофобних амінокислот полярними і незарядженими залишками з NH2 – кінця кулькового пептиду зменшує рівень макроскопічної інактивації; і цей ефект спостерігається головним чином через збільшення неблокованого рівня. Особливо важливими є мутації, які змінюють гідрофобність в позиції L7 (заміна лейцину). З цих даних видно, що тоді, коли інактиваційний домен взаємодіє зі своїм рецептором, гідрофобні взаємодії зв’язують їх докупи і сила цих взаємодій визначає рівень при якому канали повертаються до неінактивованої конформації, точніше до рівня, коли кулька дисоціює з рецептора.

Однак, профіль гідрофобності консервативний, що виходить з припущення про те, що гідрофобні взаємодії визначають стабільність комплексу кулькового пептиду з рецептором. На підтвердження цієї думки, було показано, що цитоплазматичний домен (коли він приєднується в якості химерної частинки) зв’язує сегмент 3 або 4 (мал.1) потенціал-залежних Na-каналів також здатний діяти як інактиваційна частинка для калієвих каналів. 3-4 зв’язок було запропоновано як інактиваційну кульку для Na-каналів. З цих досліджень і було зроблено висновок про те, що рецептор кулькового пептиду може мати негативний поверхневий потенціал, як було попередньо показано для внутрішніх ворітних калієвих струмів, і також обов’язково має мати гідрофобну поверхню, яка здатна взаємодіяти з першою половиною кулькового пептиду. Хоча реакція між кульковим пептидом і *ShBΔ6-46* К+ каналом бімолекулярна, в проміжку часу, який відповідає відновленню від заблокованого стану можна розрізнити два різні стани блоку. Дуже складно пояснити молекулярну природу кожного стану, але з огляду на дуже високий рівень константи зв'язування Q10 в реакції пептиду з каналом, Murrell-Lagnago and Aldrich запропонували гіпотезу про те, що два стани виникають через присутність кількох різних структурних форм пептиду в розчині. Підвищення температури збільшує концентрацію пептиду з правильною структурою для зв'язування.

Isacoff et al. встановили, що мутації в цитоплазматичній петлі, яка приєднує трансмембранні домени S4 і S5 спричинюють дикий тип інактивації в *ShakerB і drk1*, в яких інактивація індукується додаванням *ShakerB -* кулькових пептидів з внутрішньої сторони плазматичної мембрани. Відповідаючи дослідженням з кульковим пептидом, гідрофобний залишок має особливе значення для стабілізації інактивованого стану. Мутації цієї ділянки також змінюють властивості йонної провідності, з чого можна припустити їхній близький зв'язок з канальними структурами, через які перебігає йонний струм.

Деякі автори пропонують вважати, що близькість залишків, задіяних в процесі швидкої інактивації до S4 домену може створювати основу тісного зв'язку між активацією та інактивацією. Конформаційні зміни внаслідок вилучення заряджених залишків S4 спіралі можуть збільшувати афінність кульки до її рецептора. На підтримку взаємодії між доменами, задіяними в процесах активації та інактивації, Bozanilla показав, що присутність інактиваційної частинки *ShakerB* каналів сповільнює переміщення воротних зарядів під час припинення деполяризаційних пульсів. Ці результати змушують думати про можливість конформаційних перебудов, а не просто взаємодію кульки з рецепторами в процесах активації та інактивації.

Механізм блокування кульковим пептидом.

Як зазначалося вище, інактиваційна частинка поводиться схоже на блокатор йонного струму. Це було продемонстровано, використовуючи ТЕА блокатори К+ каналів в гігантському аксоні кальмара. Для того, щоб зрозуміти механізм блокування інактиваційною частинкою, необхідно повернутися до класичної біофізики.

Armstrong встановив, що внутрішньоклітинний ТЕА блокує лише канали у відкритому стані, що пов'язується з думкою про те, що ТЕА глибоко проникає в середину каналів, перекриваючи потік йонів. Така ідея протилежна до думки про можливу алостеричну дію, яку виявляє ТЕА, індукуючи довготривалі конформаційні зміни і порушення провідності йонів через канальні структури.

Виходячи з припущення про локалізацію блокатор-зв'язуючої ділянки, можна прогнозувати, що збільшення йонного струму через канал здатне дестабілізувати взаємодію блокатора з каналами і таким чином пом'якшувати блокаду.

Властивості інактиваційної частинки *ShakerB* як блокатора відкритих каналів також були продемонстровані.

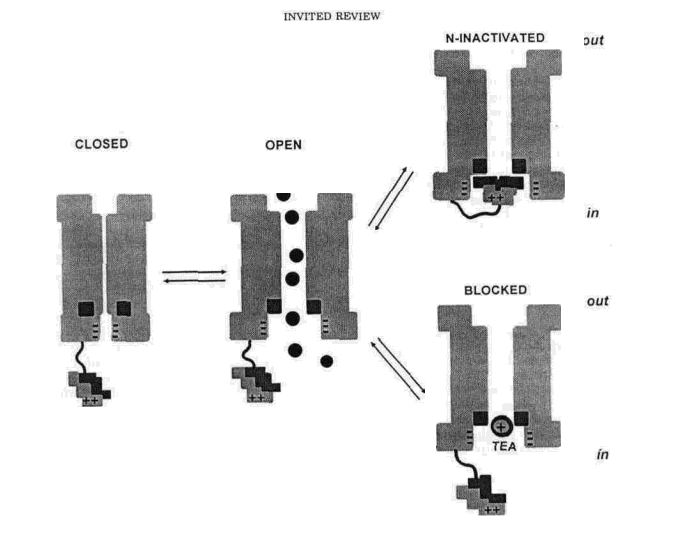
Demo and Yellen показали, що час відновлення від інактивації (тобто час, потрібний для того, щоб канальний білок повернувся від інактивованого стану до закритого неінактивованого стану) скорочується за присутності високих концентрацій К+ в зовнішньому середовищі. Це узгоджується з ідеєю про "пом'якшення інактивації".

Експерименти з ізольованими каналами підтвердили точку зору про те, що канали інактивуються у відкритому стані. Точніше, для того, щоб інактивуватись, канал спочатку має відкритися, а після приєднання, інактиваційна частинка заважає каналові повернутися до закритої конформації. Отже, просту кінетичну модель актиації можна зобразити таким чиом: С-О-І. Для того, щоб перейти від інактивованого до закритого стану, каналові необхідно відкритися. (мал.2) Інактиваційний *ShakerB* кульковий пептид поводиться як блокатор відкритих каналів.

Стехіометрія інактиваційної реакції.

З вищесказаного випливає очевидність того, що потенціал-залежні канали - це тетрамери, утворені ідентичними чи змішано - незалежними субодиницями. Коли це так, то кожен канал має 4 незалежні NH2 - кінці, потенційно здатні бути інактиваційними частинами. Скільки їх потрібно, щоб відбулася інактивація?

MacKinnon et al. підійшли до цього питання створюючи субодиничні форми *Shaker,* в яких присутність інктиваційної кульки була пов'язана з мутацією, що робить канал стійким до блокади СТХ, але не має відношення до інактивації. Цю форму каналу ін'єктували в ооцити Xenopus laevis разом з токсин-нечутливими неінактиваційними субодиницями, і очікувалась експресія тетрамерів з хаотичним випадковим складом. Достатньо лише одного токсин-зв'язуючого сайту, щоб підтвердити чутливість до токсину, коли лише однієї кульки достатньо для інактивації каналу, тоді всі токсин-чутливі канали з вбудованими 1-4 токсин чутливими субодиницями, які несуть кульки, мають інактивуватися.



Насправді, всі швидко інактиваційні компоненти, індуковані ін'єкцією змішаних субодиниць, блокувалися СТХ. Однак інактивація каналів, які містили менше ніж 4 інактиваційні частинки, була повільнішою ніж у тих, які містили всі 4 кульки. Такі дані можна трактувати аналогічно до доза-залежного рівня інактивації *ShBΔ6-46* каналів, на які діяли вільним кульковим пептидом, при чому зростання інактиваційного рівня відбувалося коли пептид був більш позитивно зарядженим. В будь-якому разі припускається, що збільшення концентрації кулькового пептиду біля його рецептора, збільшує вірогідність їхнього зв'язку і відтак - рівня інактивації; тим не менш, лише одна кулька взаємодіє з гирлом каналу.

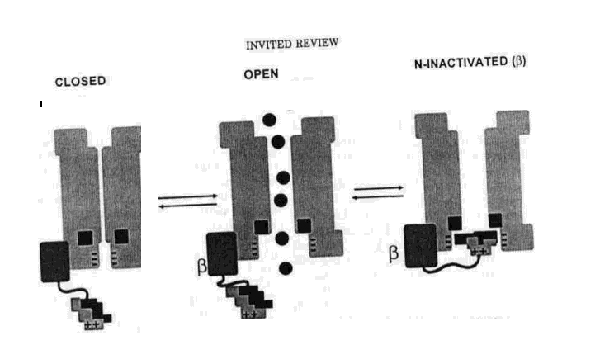
β - субодиниця швидкої інктивації.

Більшість досліджень молекулярного та біофізичного механізмів швидкої інактивації К+ каналів зосереджувалось навколо NH2 кінцевого домену а- субодиниці канального білку. Однак, деякими авторами було також висловлено думку про те, що білкові домени з інших субодиниць можуть спричинювати швидку інактивацію неінактивованих каналів, коли їх експресувати разом з а- субодиницею.

Retting et al. ідентифікували клони цДНК, які кодують 2 ізоформи В- субодиниць К+ каналів мозку щурів. Коекспресія одного з них КVB1 з мРНК, що кодує RCK1 веде до експресії швидко інактивованого струму, на відміну від експесії самого RCK1, який не інактивується. Так само, коекспресія КVB1 і RCK4 прискорює у 8 разів інактивацію експресованого окремо RCK4.

Експериментальна очевидність пітверджує ідею про те, що NH2 кінцева форма КVB1 субодиниці утворює інактиваційну частинку (В-кульку), що поводиться так само, як і ShakerB пептид. КVB1 NH2 кінець має подібну первинну структуру з NH2 кінцем інактиваційних К+ каналів ссавців (і родиною Shaker дрозофіли). Ця подібність включає кластер гідрофобних амінокислот та групу заряджених залишків. Делеція КVB1 NH2 кінця унеможливлює швидку інактивацію при коекспресії з RCK1, а додавання відповідного пептиду всередину клітини, відновлює її.

Як і у випадку з *ShakerB* пептидом, інактивація за допомогою β-кульки зростає при збільшенні позитивного заряду кульки. Більше того, коекспресія KVβ1 з ShBΔ6–46 веде до виникнення інактиваційних К+ струмів. Виявляється, що β-кулька може повністю повторювати функції раніше описаної NH2 – кінцевої ділянки α субодиниці. (мал.2, мал.3) Природньо припустити, що обидві “кульки” взаємодіють з одним тим самим сайтом на внутрішньому гирлі каналу, оскільки обидві мають гідрофобний профіль і β- інактивація дестабілізується підвищенням концентрації К+ назовні клітини, що відбувається при класичному N-типові інактивації.



Можливість комбінування різних ізоформ α чи β- субодиниць в К+ каналах розглядається як спосіб фізіологічної модуляції інактивації К+ каналів in vivo.

С- тип інактивації.

Ми вже розглянули N-тип інактивації, яка відбувається швидко, однак, виявляється, що багато К+ каналів демонструють іншу форму інктивації – повільну.

Робота Hoshi et al. показала, що саме СООН- кінцевий домен бере участь в цьому типові інактивації (інактивації за С-типом). Ця ідея виникла після спостереження того, що альтернативно сплайсовані С-кінцеві варіанти показували різний рівень повільної інактивації. Iverson & Ruby також помітили, що різні С – кінці впливають на стабільність довготривалого інактивованого стану в різних конструктах *Shaker*. Інші дослідження показали, що С- інактивація відбувається принципово іншим чином, ніж N- інактивація.

Внутрішньоклітинний ТЕА, що конкурує за зв’язування рецептора на внутрішньому гирлі каналу з кульковим пептидом, не впливає на повільну інактивацію. Але зовнішній ТЕА сповільнює С- інактивацію та зменшує макроскопічний струм у ShBΔ6–46 мутантів. Рівні інактивації мають лінійну залежність від концентрації ТЕА іззовні, і амплітуди струму також пропорційно зменшуються. Цей вплив ТЕА на С- тип інактивації відповідає моделі “нога в дверях”. Оскільки трипсин не виявив ніякого впливу на зовнішній бік каналу при С- інактивації, механізм “кульки й ланцюжка” було виключено. Тоді дослідники висловили припущення, що при С-типові інактивації відбуваються більш значні структурні перебудови з зовнішнього боку мембрани. Хоча деякі експерименти з реєстрацією струмів у дикого типа ShBΔ6–46 і підтвердили справедливість моделі “foot in the door”, однак інші дослідження показали, що ефекти проникливих йонів на С-тип інактивації не можна розглядати за такою спрощеною схемою.

Наприклад, Lopez-Barneo et al. зробили низку амінокислотних замін в *ShakerВ* каналах, які не мали N- типу інактивації і виявилося, що найдраматичніші наслідки для інактивації за С- типом мала заміна в Т449К мутанта, коли рівень інактивації зменшувався в 42 рази порівняно з нормальними каналами. Таким чином, амінокислотний залишок в 449 положенні виявляється критичним для визначення рівня інактивації. З іншого боку Lopez-Barneo помітив, що зовнішні катіони на додаток до того, що вони сповільнюють С-тип інактивації, можуть також впливати на кількість каналів, які відкриваються при деполяризації. Цей ефект більше проявлявся у тих мутантів, які характеризувалися більш швидкою С- інактивацією, а саме у Т449А, Т449Е, Т449К. В цих трьох випадках величина пікового струму на стільки залежала від зовнішньої концентрації К+ , що струм зовсім не виникав за відсутності К+ . Pardo та співробітники помітили, що калієвих струмів, індукованих KV1.4 в ооцитах Xenopus зовсім не виникало при заміні зовнішнього К+ на непроникні катіони. Цей ефект опосередкований зниженням кількості каналів, здатних до відкривання.

Подальші тонкощі механізму С-інактивації досліджував Yellen з колегами. Їм вдалося встановити, що С-тип інактивації включає в себе конформаційні зміни в зовнішньому гирлі каналу. Вони показали, що перехід від відкритого до С-інактивованого стану змінює афінність каналу до Cd2+ у 45.000 разів. А саме присутність йонів Cd2+ прискорює перехід каналу до С-інактивованого стану. Yellen запропонував таке пояснення своїх спостережень. Чотири цистеїнові залишки в 449 положенні у відкритому каналі, ймовірно, розташовані далеко один від одного, зважаючи на низьку афінність до зв’язування Cd2+ . Інактивація зводить їх докупи, утворюючи високоафінний центр зв’язування Cd2+ , який стабілізує інактивований стан.

Підсумовуючи обговорення даних по С-інактивації з певністю можна сказати, що це дуже складний процес, який відбувається не лише за допомогою СООН- кінця калієвих каналів, але проходить зі структурними перебудовами канальної структури, або близьких до неї доменів. Графічно процес, який відбувається, можна зобразити як спадання стінок каналу, через який протікає струм за участю катіонів, які впливають на зовнішню частину каналу.

Підсумок.

Та інформація, якою ми володіємо насьогодні дозволяє нам розуміти швидку інактивацію як наслідок міжмолекулярної взаємодії цитоплазматичного N-кінцевого домена з рецептором, розташованим у внутрішньому гирлі каналу. N-кінець сполучається з рештою канальної структури за допомогою ланцюжка. Інактивація за цим типом відбувається внаслідок електростатичної взаємодії між основними залишками кулькового пептиду і кислотними залишками в гирлі каналу лише тоді, коли канал перебуває у відкритому стані. Вихід каналу з інактивації відбувається внаслідок спонтанного вивільнення кулькового пептиду з рецептора.

Відомості про С-тип інактивації досі ще не дуже певні, але більшість даних свідчить про обов’язкові конформаційні зміни із зовнішнього боку канальної структури в процесі такої інактивації.

Використана література.

1. Kukuljan Manuel, Pedro Labarca and Ramon Latorre. Molecular determinants of ion conduction and inactivation in K+ channels. /*Am.J.Physiol.268. C535-556,1995.*
2. Sanguinetti M.C. and Jurkiewicz N.K. Delayed Rectifier Potassium Channels of Cardiac Muscle /*Am.J.Physiol.. C120-142,1995.*
3. Karen K.Deal, Sarah K. England. Molecular Physiology of Cardiac Potassium Channels/*Physiological reviews,vol 76#1,C49-76,1996.*