

УДК: 577.352.5

### Інактиваційні властивості дикого ( $Ca_v3.1_{wt}$ ) та мутантного ( $Ca_v3.1_{Q172H}$ ) кальцієвих каналів при дії нікелю

О.В.Носаль, О.І.Болдирєв, О.П.Любанова, Я.М.Шуба

*Міжнародний центр молекулярної фізіології НАН України; Інститут фізіології імені О.О.Богомольця НАН України; Державна ключова лабораторія молекулярної і клітинної біології (Київ, Україна)  
elena\_n@biph.kiev.ua*

Вивчали вплив  $Ni^{2+}$  на властивості інактивації  $Ca_v3.1$ -каналу дикого типу ( $Ca_v3.1_{wt}$ ) та його мутанту –  $Ca_v3.1_{Q172H}$ -каналу. Дослідження проведені за допомогою стандартної методики двохелектродної фіксації потенціалу. Показано, що при використанні  $Ca^{2+}$  в якості переносника заряду, на відміну від  $Sr^{2+}$  (крім  $Ca_v3.1_{Q172H}$ -каналів) чи  $Ba^{2+}$ , параметри стаціонарної інактивації статистично значуще не змінювались в обох каналах при дії нікелю.

**Ключові слова:** T-тип кальцієвих каналів,  $Ca^{2+}$ , ооцити *Xenopus*,  $Ni^{2+}$ .

### Инактивационные свойства дикого ( $Ca_v3.1_{wt}$ ) и мутантного ( $Ca_v3.1_{Q172H}$ ) кальциевых каналов при действии никеля

О.В.Носаль, О.І.Болдирєв, О.П.Любанова, Я.М.Шуба

Изучали влияние  $Ni^{2+}$  на свойства инактивации  $Ca_v3.1$ -канала дикого типа ( $Ca_v3.1_{wt}$ ) и его мутанта –  $Ca_v3.1_{Q172H}$ -канала. Исследования проведены с помощью стандартной методики двухэлектродной фиксации потенциала. Показано, что при использовании  $Ca^{2+}$  в качестве переносчика заряда, в отличие от  $Sr^{2+}$  (кроме  $Ca_v3.1_{Q172H}$ -каналов) или  $Ba^{2+}$ , параметры стационарной инактивации статистически значимо не изменялись в обоих каналах при действии никеля.

**Ключевые слова:** T-тип кальциевых каналов,  $Ca^{2+}$ , ооциты *Xenopus*,  $Ni^{2+}$ .

### Effect of $Ni^{2+}$ on inactivation properties of wild type ( $Ca_v3.1_{wt}$ ) and mutant ( $Ca_v3.1_{Q172H}$ ) calcium channels

О.В.Носаль, О.І.Болдирєв, О.П.Любанова, Я.М.Шуба

The aim of study was to investigate the effect of  $Ni^{2+}$  on  $Ca_v3.1_{wt}$ - and  $Ca_v3.1_{Q172H}$ -channels inactivation. Membrane currents in the oocytes were recorded using a conventional double-microelectrode voltage-clamp technique. It is shown that in the presence of either  $Sr^{2+}$  (except the  $Ca_v3.1_{Q172H}$ -channels) or  $Ba^{2+}$ , but not  $Ca^{2+}$ , as an extracellular charge carrier, for both channels, the shift in stationary inactivation parameters was statistically significant.

**Key words:** T-type calcium channels,  $Ca^{2+}$ , *Xenopus* oocytes,  $Ni^{2+}$ .

#### Вступ

Потенціалокеровані кальцієві канали характеризуються здатністю через деякий час після відкриття у відповідь на деполяризацію переходити в непровідний стан (інактивуватися). Цей процес є дуже важливим з огляду на його вплив на регуляцію фізіологічних процесів, які залежать від кількості кальцію, що надходить в клітину під час її електричної активності (Yunker, McEnergy, 2003).

Кальцієві канали T-типу ( $Ca_v3.1$ - $Ca_v3.3$ ) різняться між собою за своїми біофізичними властивостями, а їх воротні процеси зазнають змін внаслідок дії численних чинників, зокрема таких, як біоактивні ліпіди, окисно-відновні агенти, глутамат, сигнальні молекули, тощо (Iftinca, 2011).

Відомо, що T-канали характеризуються варіабельністю чутливості до дії іонів нікелю. З'ясовано, що найбільш чутливі до їхньої дії  $Ca_v3.2$ -канали в своїй структурі мають позаклітинне місце зв'язування для цього катіона, що сформоване амінокислотами IS3-IS4 ділянки з визначальним молекулярним елементом – гістидином, що знаходиться в 191 позиції (H191) (Kang et al., 2006).

Варто зазначити, що серед усіх потенціалозалежних кальцієвих каналів лише  $Ca_v2.3$ - та  $Ca_v3.2$ -канали містять гістидин в ділянці IS3-IS4 петлі. Окрім того, серед усіх високопорогових кальцієвих каналів, саме  $Ca_v2.3$ -канали під дією нікелю демонструють найбільший зсув у потенціалозалежності воротних процесів (Zamponi, 1996). Це може вказувати на особливу роль цього амінокислотного залишку в модуляції роботи кальцієвих каналів, що його містять, при дії нікелю.

Метою даної роботи стало дослідження впливу Ni<sup>2+</sup> на властивості інактивації Ca<sub>v</sub>3.1-каналу дикого типу (Ca<sub>v</sub>3.1<sub>w/t</sub>) та його мутанту – Ca<sub>v</sub>3.1<sub>Q172H</sub>-каналу, у якого глутамін (Q) в еквівалентній позиції до H191 Ca<sub>v</sub>3.2-каналу замінений гістидином, і його залежність від типу проникаючого іону.

### Матеріали та методи

Досліди проводили на ооцитах *Xenopus laevis*, що експресували Ca<sub>v</sub>3.1-канал дикого типу (Ca<sub>v</sub>3.1<sub>w/t</sub>) та його Q172H-мутант (Ca<sub>v</sub>3.1<sub>Q172H</sub>-канал). Ооцити були виділені за стандартною методикою (Осипенко и др., 2003). Процедура приготування та ін'єкції матричної РНК (мРНК) клонованого Ca<sub>v</sub>3.1-каналу дикого типу та його мутанту – Ca<sub>v</sub>3.1<sub>Q172H</sub>-каналу була детально описана нами раніше (Носаль та ін., 2012).

Струми через експресовані кальцієві канали вимірювали із застосуванням методики двохелектродної фіксації потенціалу в розчині, що містив в якості переносника заряду Ca<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup> чи Ba<sup>2+</sup>. Склад розчину був таким (ммоль/л): CaCl<sub>2</sub> (або BaCl<sub>2</sub>, або SrCl<sub>2</sub>) – 10,0, TEA-Cl – 107,5, HEPES – 5,0 (pH 7,4 встановлювався за допомогою TEA-OH). Нікель (II) хлорид гексагідрат (NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O) спочатку розчиняли в деіонізованій воді, отримуючи таким чином 100 мМ стоковий розчин, який потім додавали безпосередньо в розчини для вимірювання струмів до бажаної концентрації (60 або 300 мкМ).

Для пригнічення ендогенної кальційзалежної хлорної провідності, за 30 хвилин до початку експерименту в ооцит вводили 50 нл буферного розчину ВАРТА (20 мМ; pH 7,4 встановлювався за допомогою КОН).

Обробку та аналіз результатів проводили за допомогою програмного забезпечення Clampfit 9.0 ("Axon Instruments", США) та OriginPro 8 ("OriginLab Corp.", США). Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням t-критерію Стьюдента.

### Результати досліджень та обговорення

На 4-7 день після ін'єкції в ооцити мРНК, що кодує Ca<sub>v</sub>3.1- або химерний Q172H-канал, ми спостерігали експресію цих каналів за наявністю вхідних Ca<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup> чи Ba<sup>2+</sup>-струмів (Носаль та ін., 2012).

Характеристика стаціонарної інактивації для кожної клітини будувалась як залежність амплітуд кальцієвого, стронцієвого чи барієвого струмів при тестуючій деполяризації до V<sub>m</sub> = -20 мВ від величини кондиціонуючого потенціалу в діапазоні -120 ÷ -30 мВ.

Апроксимація отриманих експериментальних точок функціями Больцмана дозволила визначити параметри стаціонарної інактивації як в контролі для кальцієвого, стронцієвого та барієвого струму через Ca<sub>v</sub>3.1<sub>w/t</sub>- та Ca<sub>v</sub>3.1<sub>Q172H</sub>-канали, так і при дії нікелю.

Таблиця 1.

Параметри стаціонарної інактивації в контролі для кальцієвого, стронцієвого та барієвого струму через Ca<sub>v</sub>3.1<sub>w/t</sub>-канали при дії 300 мкМ та Ca<sub>v</sub>3.1<sub>Q172H</sub>-канали при дії 60 мкМ нікелю; n=4–8

Канал	Пара-метр	Ca <sup>2+</sup>		Sr <sup>2+</sup>		Ba <sup>2+</sup>	
		контроль	нікель	контроль	нікель	контроль	нікель
Ca <sub>v</sub> 3.1 <sub>w/t</sub>	V <sub>1/2</sub> , мВ	-70.4	-69.8	-77.3	-76.9*	-73.1	-70.2**
	k, мВ	4.6	4.5	5.4	8.1*	4.6	10.8**
Ca <sub>v</sub> 3.1 <sub>Q172H</sub>	V <sub>1/2</sub> , мВ	-68.5	-66.9	-71.7	-70.5	-76.3	-75.9
	k, мВ	7.4	5.5	5.8	6.7	4.0	6.0**

Примітка: \*p<0,05, \*\*p<0,01 у порівнянні з контролем.

З табл. 1 видно, що нікель призводить до статистично значущого зсуву потенціалу половинної інактивації в бік позитивних значень для стронцієвих та барієвих струмів через Ca<sub>v</sub>3.1<sub>w/t</sub>-канали, що може вказувати на його вплив, в даному діапазоні концентрацій, на величину поверхневого потенціалу при використанні цих переносників.

Виявлено статистично значуще зростання фактору крутизни k для стронцієвих струмів через Ca<sub>v</sub>3.1<sub>w/t</sub>-канали та барієвих струмів через обидва досліджуваних канали. Цікаво, що цей параметр для барієвих струмів через Ca<sub>v</sub>3.1<sub>w/t</sub>-канали зростає найбільше серед усіх струмів з різними переносниками заряду.

Зростання значень фактору крутизни – k вказує на те, що нікель змінює воротний заряд в обох каналах. Водночас ступінь таких змін залежить від типу проникаючого іону. Це може бути обумовлено тим, що в Ca<sub>v</sub>3.1-каналі існує зв'язок між амінокислотними залишками селективного фільтру і

воротним механізмом (Talavera et al., 2003), а також іншими молекулярними детермінантами (з їх відповідними особливостями внаслідок мутації), що взаємодіють із досліджуваними катіонами.

Слід зазначити, що при використанні  $\text{Ca}^{2+}$  як переносника заряду параметри стаціонарної інактивації не зазнавали статистично значущих змін в обох каналах. Це, ймовірно, пояснюється зниженням афінності для нікелю в цьому випадку.

Попередніми дослідженнями показано, що взаємодія нікелю з  $\text{Ca}_v3.1_{wt}$ -каналами, експресованими в HEK-293 клітинах, призводить до змін в воротних характеристиках каналу. Зокрема, показано, що під дією нікелю відбувається зсув активаційної кривої в бік позитивних потенціалів і збільшення фактору крутизни (Lacinova et al., 2000).

Отримані нами дані узгоджуються з результатами (Kang et al., 2006), які також показали зсув потенціалу половинної інактивації в бік позитивних значень для бар'єрних струмів через  $\text{Ca}_v3.1_{wt}$ -канали під дією  $\text{Ni}^{2+}$  та відсутність його суттєвих змін для  $\text{Ca}_v3.1_{Q172H}$ -каналів. В цій же роботі висловлюється припущення про те, що нікель, зв'язуючись з гістидином, що знаходиться в 191 позиції (H191) в ділянці IS3-IS4 петлі, впливає на воротні процеси, стабілізуючи канал в закритому стані.

Нещодавно було уточнено, що сайт зв'язування для нікелю та інших мікроелементів, таких як мідь та цинк, в  $\text{Ca}_v3.2$ -каналах утворений Asp-Gly-His мотивом в IS3-IS4 ділянці і залишком аспартату в ділянці IS2 (Kang et al., 2010). Це сприятиме ще більш детальному аналізу природи ефектів нікелю на воротні процеси в кальцієвих каналах.

### Висновки

Таким чином, наявність змін в параметрах стаціонарної інактивації в обох каналах при дії нікелю залежить від типу проникаючого іону та каналу і є, ймовірно, відображенням опосередкованої модуляції воротних процесів в цих каналах.

Автори вдячні доктору Е.Пересу-Реесу (Університет штату Вірджинія, США) за надання клонів низькопорогових кальцієвих каналів.

### Список літератури

- Носаль О.В., Любанова О.П., Шуба Я.М. Комплексна модуляція  $\text{Ca}_v3.1$  Т-типу кальцієвих каналів нікелем // Вісник Луганського національного університету ім. Тараса Шевченка. – 2012. – №17(252). – С. 115–123. /Nosal O.V., Lyubanova O.P., Shuba Y.M. Kompleksna modulyatsiya  $\text{Ca}_v3.1$  T-typu kaltsievyykh kanaliv nikel'em // Visnyk Luganskogo natsionalnogo universytetu im. Tarasa Shevchenka. – 2012. – №17 (252). – S.115-123./
- Осипенко В.Н., Найденов В.Г., Костюк П.Г. и др. Блокирование клонированных низкопороговых кальциевых каналов нейролептическими препаратами // Нейрофизиология. – 2003. – Т.35, №1. – С. 9–18. /Osipenko V.N., Naydenov V.G., Kostyuk P.G. i dr. Blokirovaniye klonirovannykh nizkoporogovykh kaltsievyykh kanalov neyrolepticheskimi preparatami // Neurophysiologiya. – 2003. – T.35, №1. – S. 9–18./
- Yunker A.M., McEnergy M.W. Low-voltage-activated ("T-Type") calcium channels in review // J. Bioenerg. Biomembr. – 2003. – Vol.35 (6). – P. 533–575.
- Iftinca M.C. Neuronal T-type calcium channels: what's new? Iftinca: T-type channel regulation // J. Med. Life. – 2011. – Vol.4 (2). – P. 126–138.
- Kang H.W., Park J.Y., Jeong S.W. et al. A molecular determinant of nickel inhibition in  $\text{Ca}_v3.2$  T-type calcium channels // J. Biol. Chem. – 2006. – Vol.281. – P. 4823–4830.
- Zamponi G.W., Bourinet E., Snutch T.P. Nickel block of a family of neuronal calcium channels: subtype- and subunit-dependent action at multiple sites // J. Membrane Biol. – 1996. – Vol.151. – P. 77–90.
- Talavera K., Janssens A., Klugbauer N. et al. Pore structure influences gating properties of the T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\alpha 1G$  // J. Gen. Physiol. – 2003. – Vol.121. – P. 529–540.
- Lacinova L., Klugbauer N., Hofmann F. Regulation of the calcium channel  $\alpha 1G$  subunit by divalent cations and organic blockers // Neuropharmacology. – 2000. – Vol.39. – P. 1254–1266.
- Kang H.W., Vitko I., Lee S.S. et al. Structural determinants of the high affinity extracellular zinc binding site on  $\text{Ca}_v3.2$  T-type calcium channels // J. Biol. Chem. – 2010. – Vol.285 (5). – P. 3271–3281.

Представлено: Г.В.Соткіс / Presented by: G.V.Sotkis

Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky

Подано до редакції / Received: 01.11.2013