

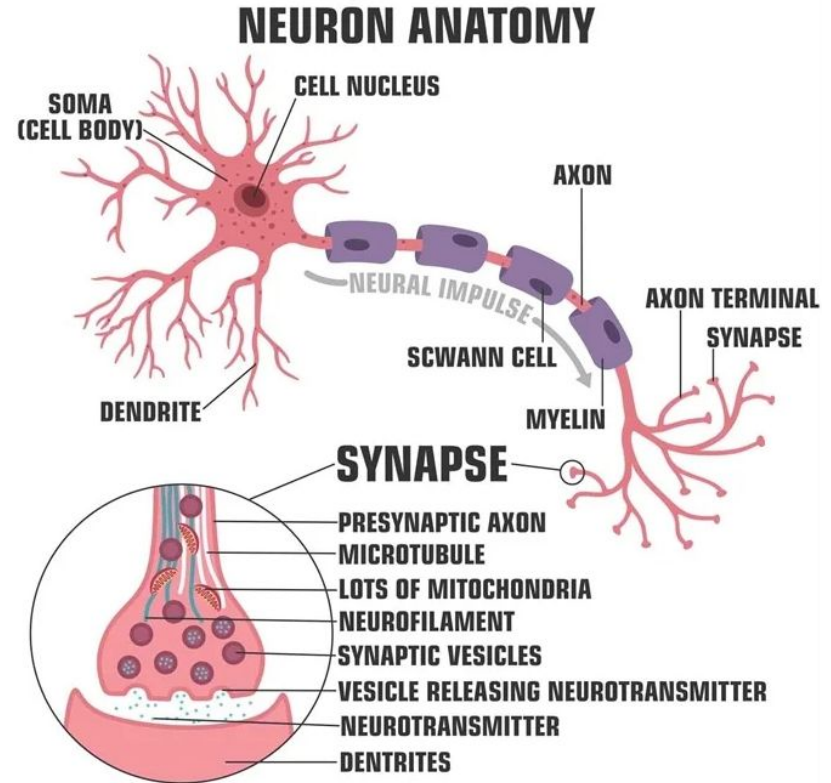
Napetostno - odvisni ionski kanali

Seminarska naloga pri izbirnem predmetu Biološke membrane

Študentje: Leila Bohorč, Gal Kastelic, Mia Kobal, Suzana Kučuk, Pia Trošt

Uvod

- Osnova hitre in učinkovite signalizacije, ki jo živčni sistem ima, so bioelektrični signali – akcijski potenciali – ki jih uravnavajo posebni proteinski kanali, vgrajeni v celične membrane.
- Napetostno - odvisni ionski kanali zaznavajo spremembe električnega potenciala membrane in se glede na to odpirajo ali zapirajo, kar posledično omogoča selektivni prehod specifičnih ionov (najpogosteje Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ali Cl^-) skozi plazemsko membrano živčnih celic → temelj živčne aktivnosti, mišične kontrakcije, hormonske signalizacije in številnih drugih procesov.



Uvod: **Tipi kanalov**

Kalcijevi kanali

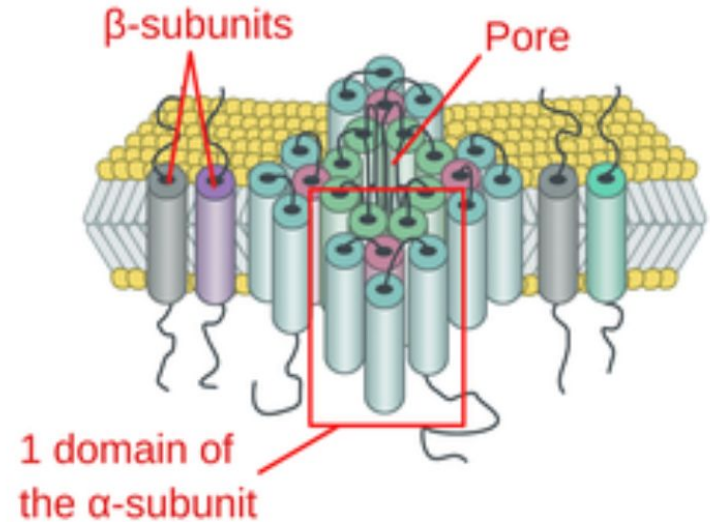
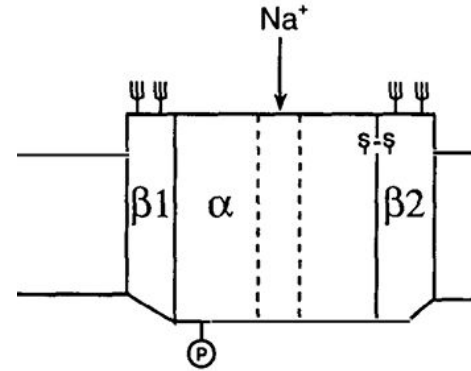
Kalijevi kanali

Natrijevi kanali

Kloridni kanali

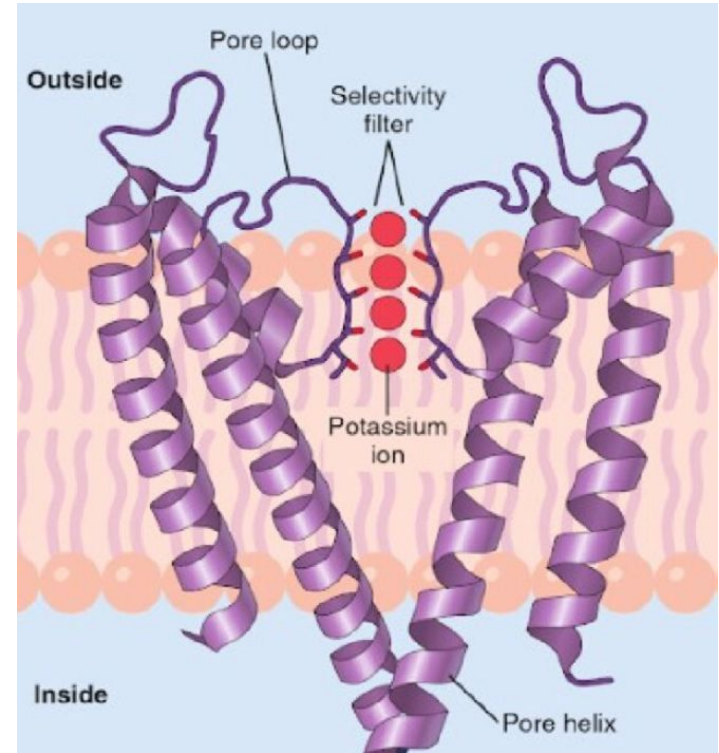
Uvod: Natrijevi kanali

- Ključni za hitro depolarizacijo membrane med akcijskim potencialom v živčnih in mišičnih celicah.
- Poznanih je devet podtipov (Nav1.1 – Nav1.9), ki se razlikujejo glede na tkivno ekspresijo, kinetične lastnosti in občutljivost na toksine in zdravila.
- Glavna funkcija je omogočiti hiter in selektiven vstop Na^+ ionov v celico, in sicer takrat, ko membranski potencial doseže določeni prag.



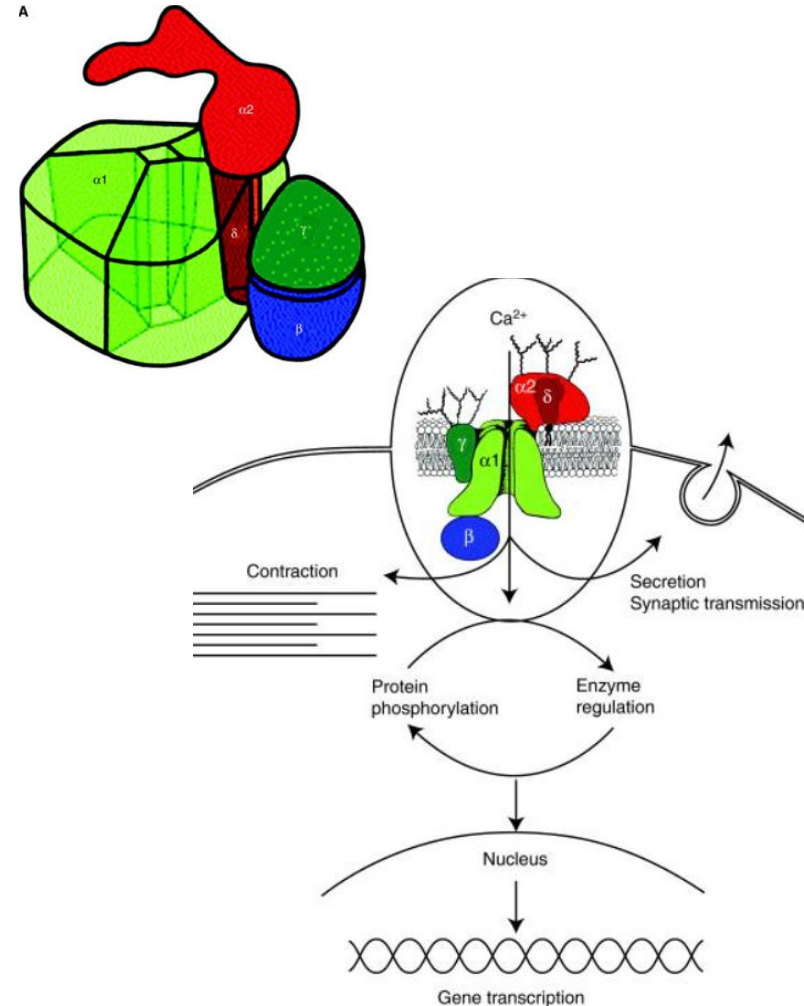
Uvod: **Kalijevi kanali**

- Omogočajo selektivni iztok K^+ ionov iz celice, kar prispeva k repolarizaciji membrane po akcijskem potencialu.
- Številne družine Kv kanalov, od Kv1 do Kv12, sodelujejo pri nastanku ritmične aktivnosti in se nahajajo v različnih delih telesa kot so mišice, srce in možgani.
- Selektivnost za K^+ je izjemno visoka, le to pa omogoča t.i. selektivni filter, ki temelji na motivu GYG v P-zanki med segmentoma S5 in S6.



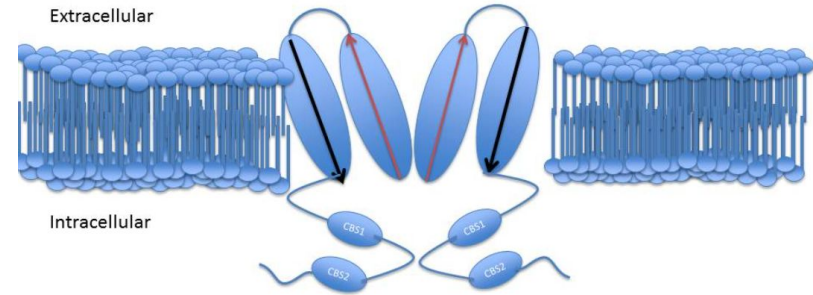
Uvod: **Kalcijevi kanali**

- Uravnavajo vstop Ca^{2+} ionov v celico kot odziv na depolarizacijo membrane.
- Cav kanale delimo glede na njihovo občutljivost na farmakološke blokatorje in elektrofiziološke lastnosti na:
 - **L-tip** (Cav1.1 – 1.4): prisotni v srčni in skeletni mišici, blokirajo jih dihidropiridini.
 - **S-, P/Q- in R-tipi** (Cav2.1 – 2.3): prisotni predvsem v nevronih, sodelujejo pri sinaptičnem prenosu.
 - **T-tip** (Cav3.1 – 3.3): aktivirani pri nizkih napetostih, pomembni pri ritmični aktivnosti

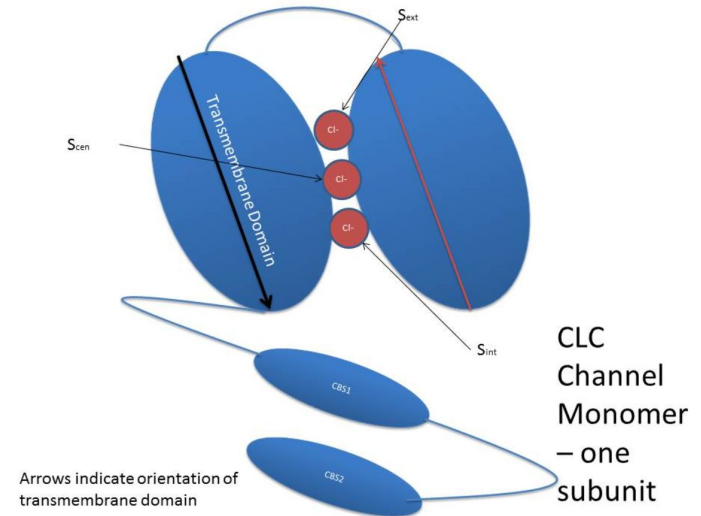


Uvod: **Kloridni kanali**

- Najbolj poznana družina so CLC kanali, ki delujejo bodisi kot kloridni kanali bodisi kot Cl^-/H^+ antiporterji.
- Strukturno so CLC proteini organizirani kot dimeri in za razliko od drugih napetostno odvisnih ionskih kanalov, CLC proteini nimajo značilnega S4 napetostnega senzorja.

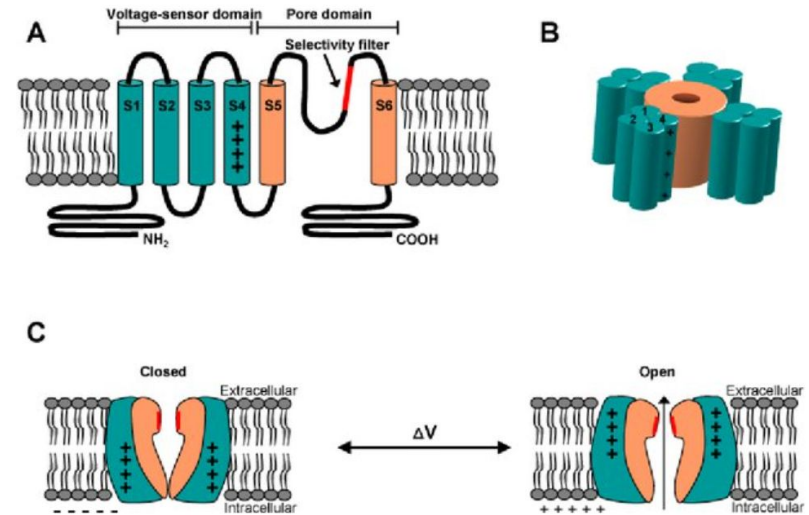


CLC channel dimer



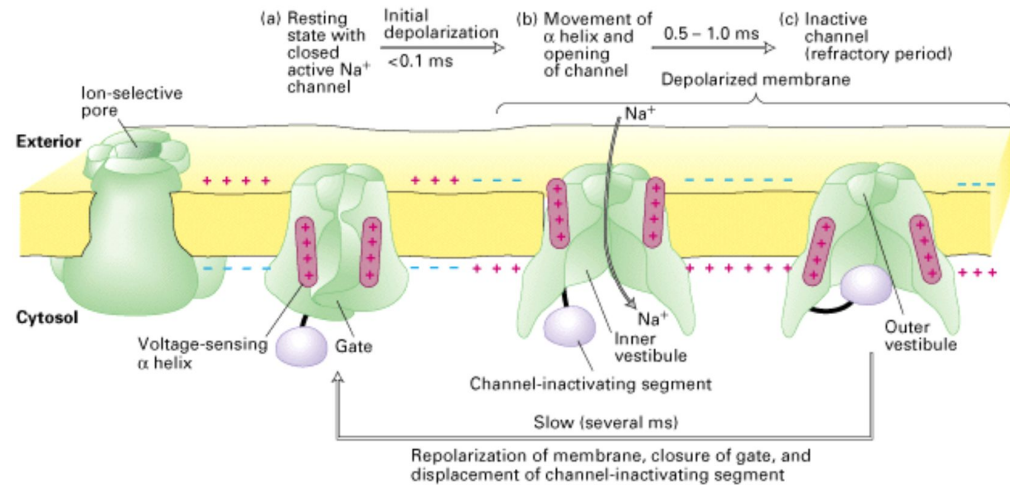
Uvod: Zgradba kanalov

- Transmembranski segmenti α -podenote (S1–S6).
- Selektivni filter: Med segmentoma S5 in S6 se nahaja zanka, ki vstopa v membrano in oblikuje ionski selektivni filter.
- Funkcionalnost VGIC kanalov je pogosto modulirana s pomočjo dodatnih, neprevodnih podenot, ki se vežejo na osnovno α -podenoto.
- Intracelične domene: VGIC kanali imajo poleg transmembranskih segmentov tudi pomembne znotrajcelične domene, vključno z velikimi zankami med S6 in S1 naslednje podenote ter s C- in N-terminalnimi repi.



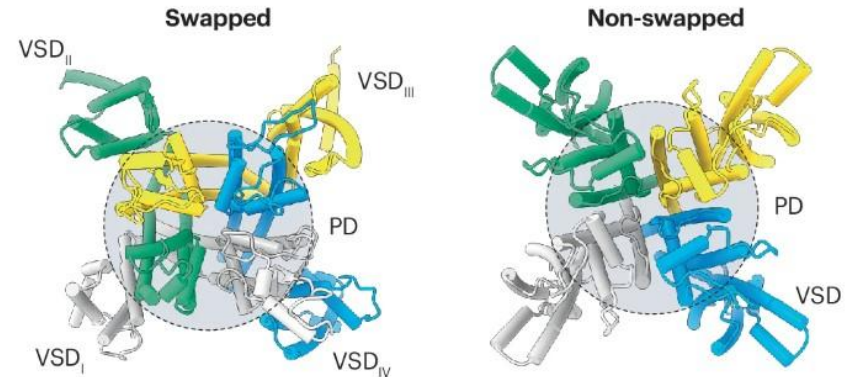
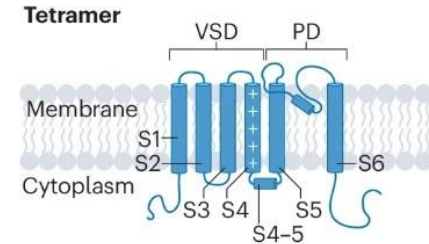
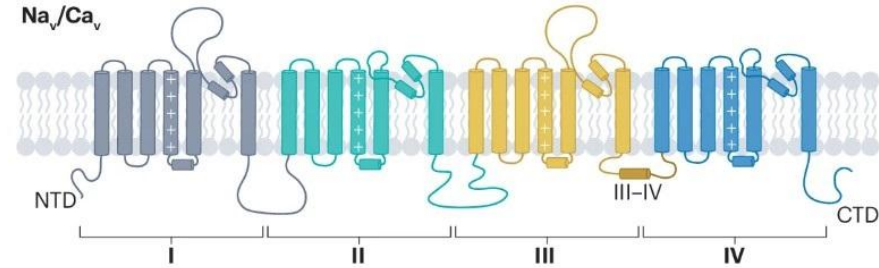
Uvod: Gating mehanizmi (odpiranje in zapiranje kanalov)

- *Aktivirano stanje:* Ob depolarizaciji membrane se S4 segmenti pomaknejo proti zunanosti membrane, kar povzroči konformacijsko spremembo, ki vodi do odprtja ionske pore.
- *Inaktivirano stanje:* Po odprtju kanal pogosto hitro preide v stanje inaktivacije, kar preprečuje nadaljnji pretok ionov.
- *Deaktivirano (počivajoče) stanje:* Ko se membrana repolarizira, se S4 segmenti vrnejo v prvotno stanje in kanal se zapre.



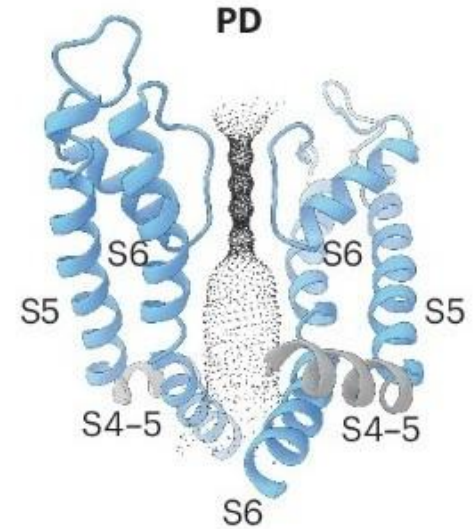
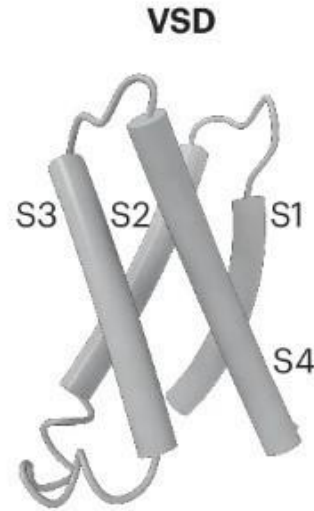
3D struktura

- 4 transmembranske domene okoli osrednje pore
- Nav in Cav: 1 α -podenota s 4 ponovitvami
- Kv: 4 ločene podenote
- dve arhitekturi:
 - *domensko-zamenjana* (VSD $\rightarrow$ sosednja ponovitve)
 - *nedomensko-zamenjana* (VSD $\rightarrow$ ista ponovitve)



3D struktura

- segmenti S6 se zložijo v snop štirih vijačnic (črka V)
 - definirajo spodnja vrata
- segment S5 tvori steno pore
- vijačnica S4-S5 je značilna za »domensko-zamenjano« arhitekturo

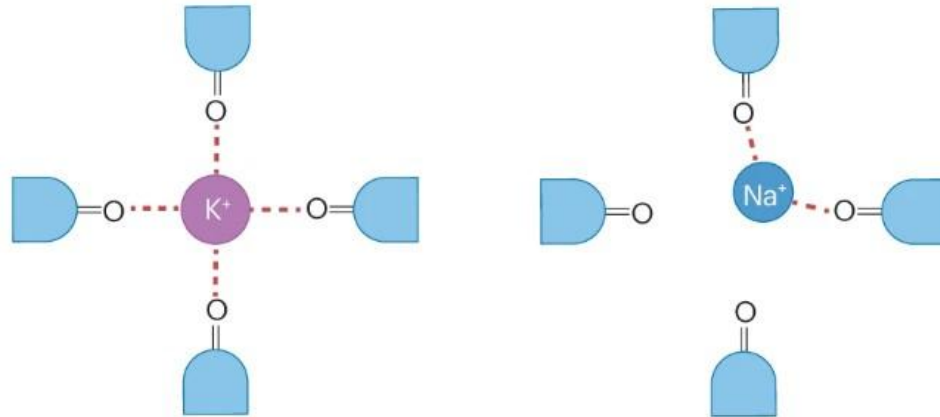
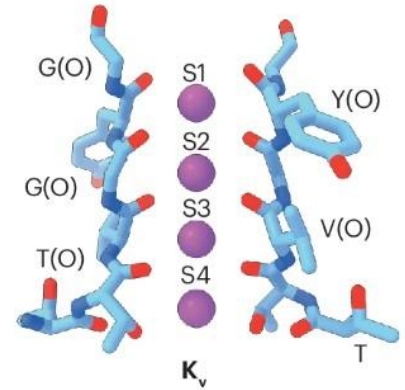


Struktura: **lonska selektivnost in permeabilnost**

- temelji na velikosti iona, naboju, hidratacijskem ovoju

Kv kanali:

- TVGYG motiv – selektivnost za K^+
- karbonilne skupine koordinirajo dehidrirane K^+ ione
- manjši ioni (Na^+), ne vzpostavijo stabilnih interakcij



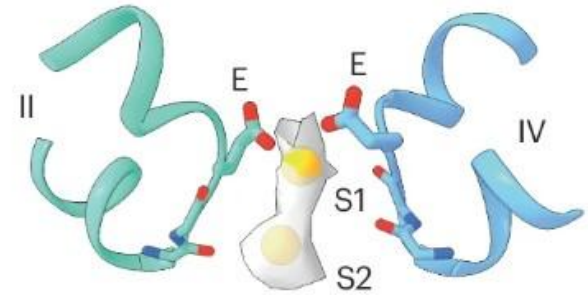
Struktura: **lonska selektivnost in permeabilnost**

Cav kanali:

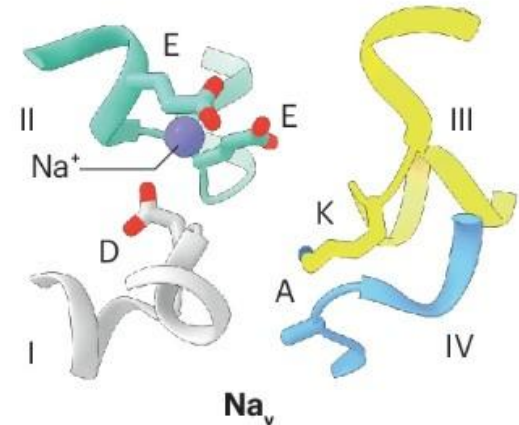
- EEEE/EEDD motiv – visoka selektivnost za Ca^{2+}
- model z dvema vezavnima mestoma (S1 in S2)

Nav kanali:

- DEKA motiv – selektivnost za Na^+ , vloga lizina
- DEE mesto – sodelovanje Glu in Lys
- Lys tvori solni mostiček, se deprotonira/reprotonira

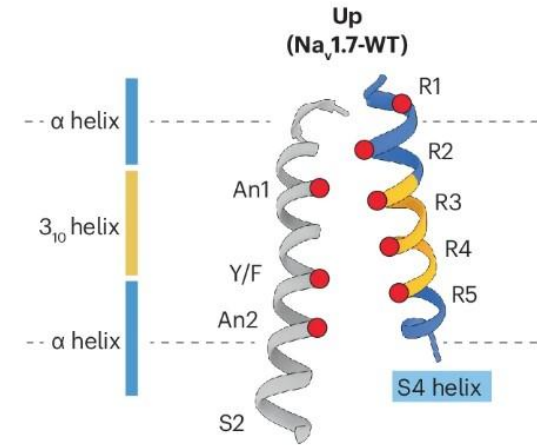
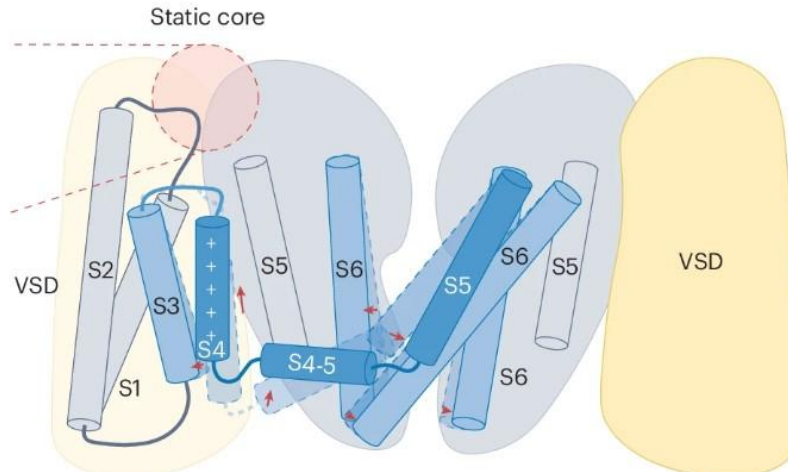


Ca_v (10 mM Ca^{2+})



Struktura: **Elektromehanska sklopitev (EMC)**

- S4 segment: pozitivno nabiti ostanki (Arg, Lys)
- premik S4 v odziv na depolarizacijo → aktivacija (pomik navzven)
- 3_{10} vijačnica – nabiti ostanki poravnani
- »ramenski del« pore (S5–S6) ostaja stabilen
 - Nav: dodatna stabilizacija z disulfidnimi vezmi
- S4–S5 heliks prenaša signal → vpliva na S6



Struktura: **Inaktivacija VGIC**

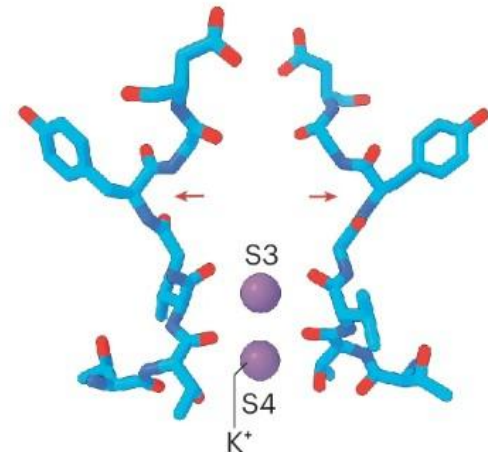
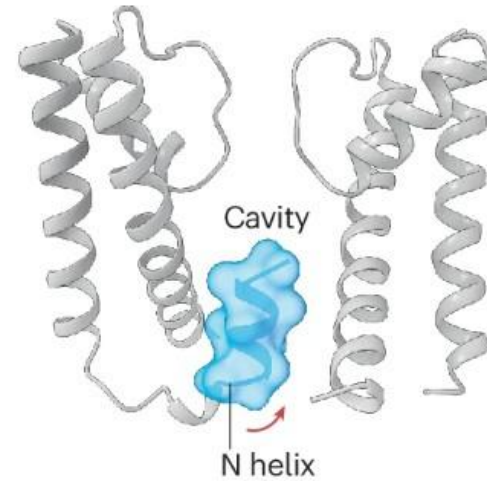
- po odprtju kanala ali že iz mirovnega stanja

N-tip:

- hiter mehanizem – N-terminalni čep blokira poro
- model »ball-and-chain«

C-tip:

- počasna inaktivacija – razširitev selektivnega filtra



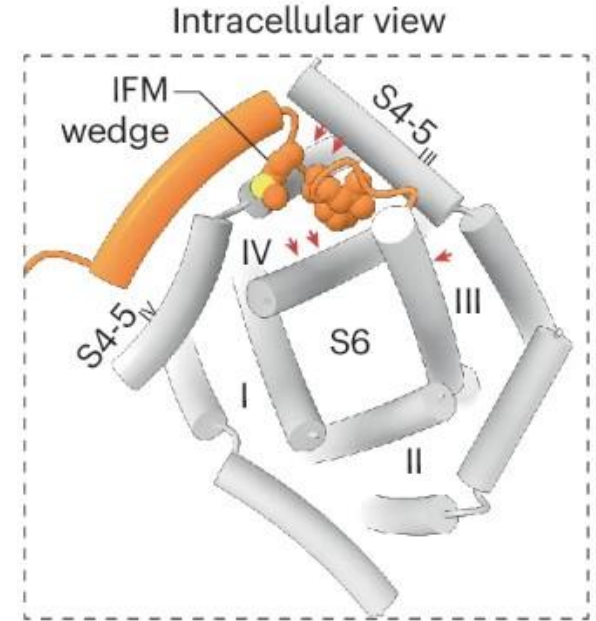
Struktura: **Inaktivacija VGIC**

Nav hitra inaktivacija:

- IFM motiv (DIII–DIV povezava)
- vstavi se med S5, S6 in S4–S5 (»door wedge« model)
- destabilizacija povezave → zaprtje kanala (kontrakcija S6)

Inaktivacija Cav kanalov:

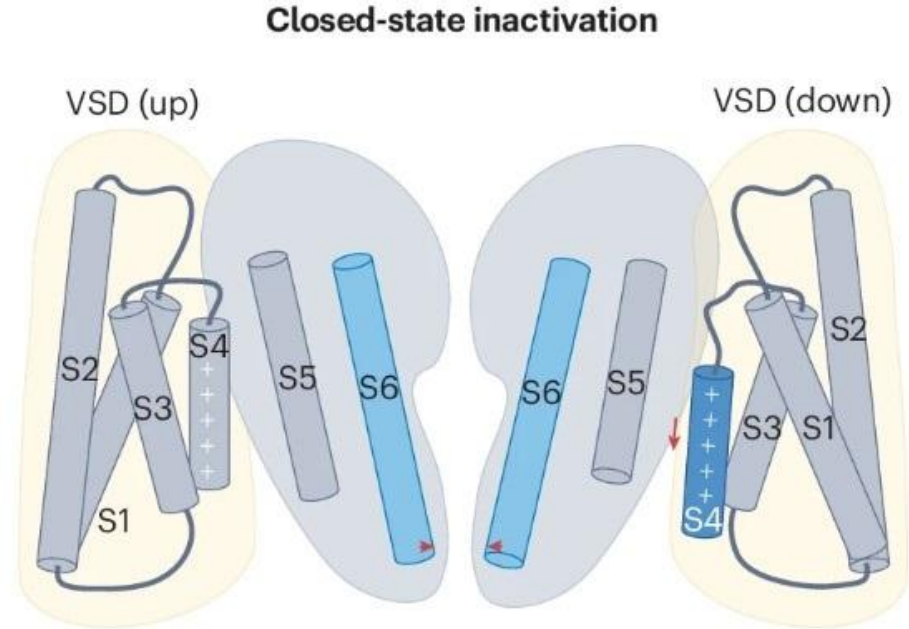
- CDI – (L-tip) kalmodulin se veže na C-konec kanala
- VDI – (P/Q-tip) $\alpha 1$ -interakcijska domena + β podenote



Struktura: **Inaktivacija VGIC**

Inaktivacija iz zaprtja (closed-state inactivation):

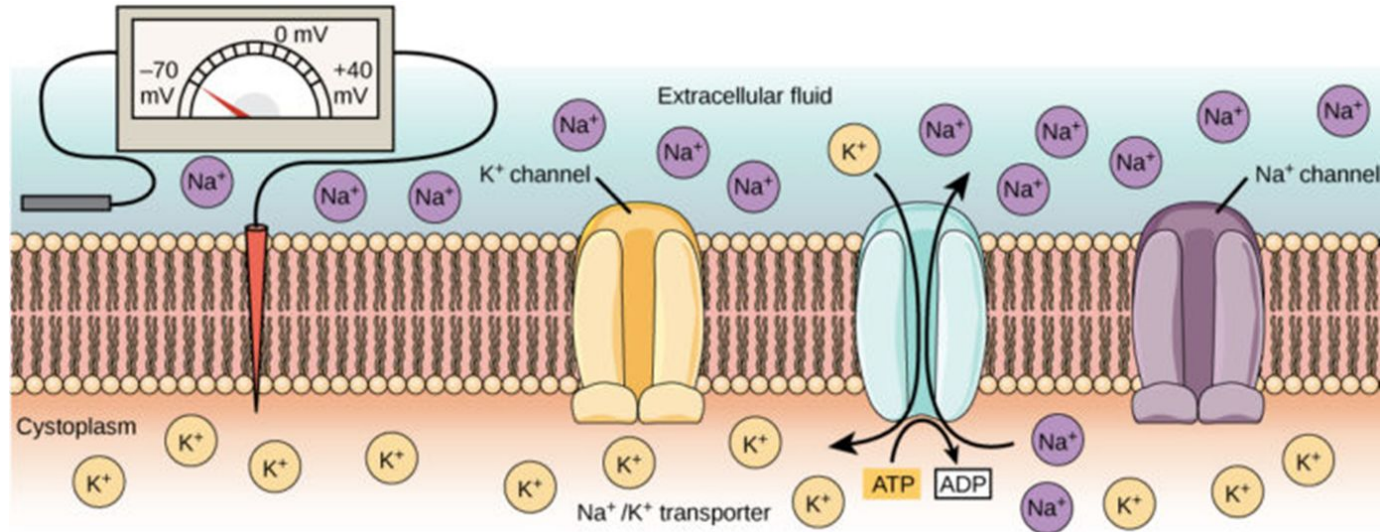
- opažena pri vseh (bolj raziskana pri Cav)
- dodatni heliksi CH1II in CH2II iz segmenta S6
- Trp stabilizira zapiralni del pore
- VSDII v deaktiviranem stanju → asimetrična aktivacija



Fiziološke vloge: **Akcijski potencial**

Membranski potencial

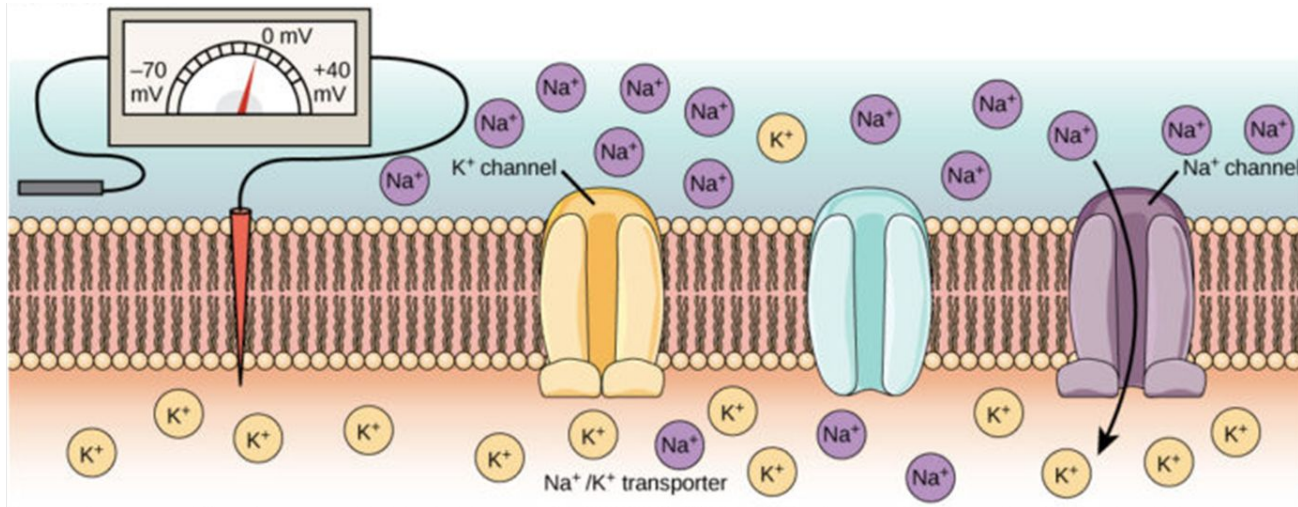
- mirovni: -70 mV
 - kalijevi ionski kanali, Na^+/K^+ ATPaza



Fiziološke vloge: **Akcijski potencial**

Depolarizacija

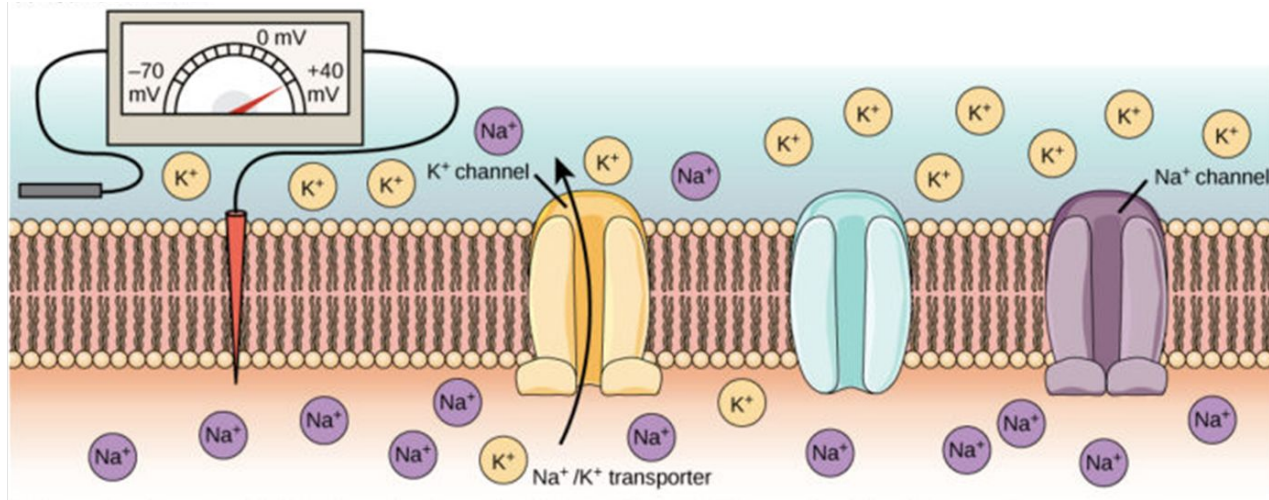
- pragovni potencial: -55 mV
- odpiranje Nav kanalov → vdor Na^+ ionov v celico
- pozitivno povratna zanka delovanja
- hitro



Fiziološke vloge: **Akcijski potencial**

Repolarizacija, hiperpolarizacija

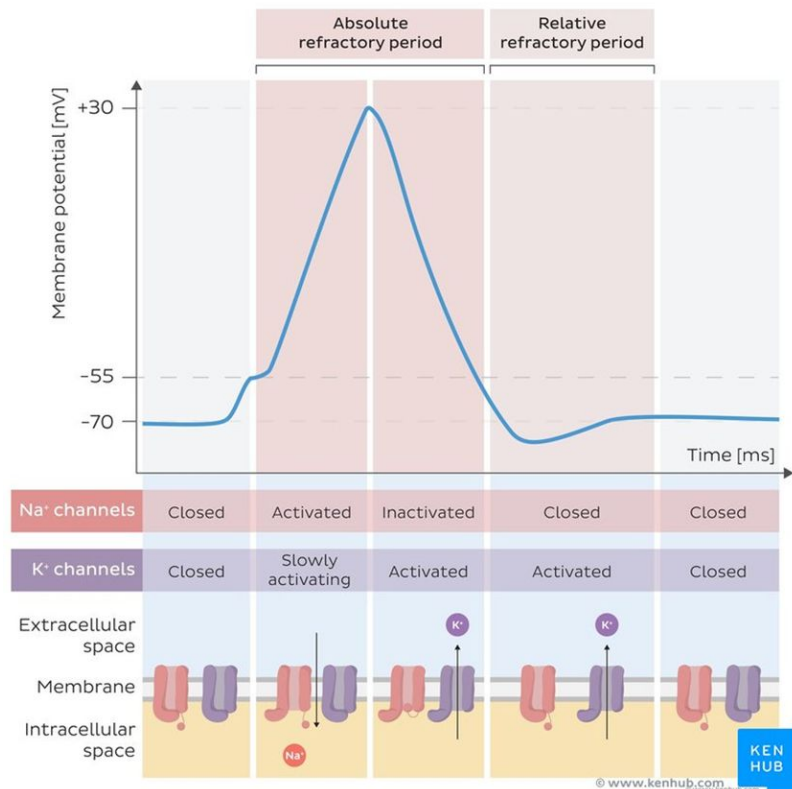
- zaprti Nav kanali
- počasno odpiranje Kv kanalov → izstop K^+
- počasno zapiranje Kv kanalov



Fiziološke vloge: **Akcijski potencial**

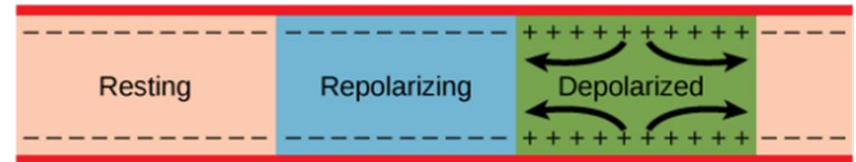
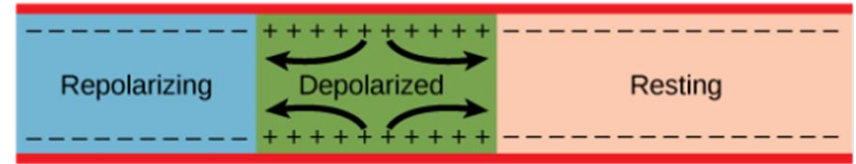
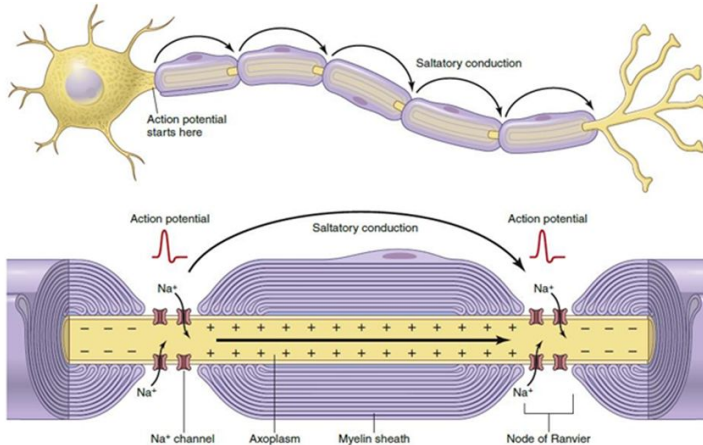
Neodzivna/refraktarna doba

- absolutna refraktarna doba: ni novega nastanka akcijskega potenciala
- relativna refraktarna doba: potreben močnejši dražljaj
- posledica inaktiviranosti Na⁺ kanalov



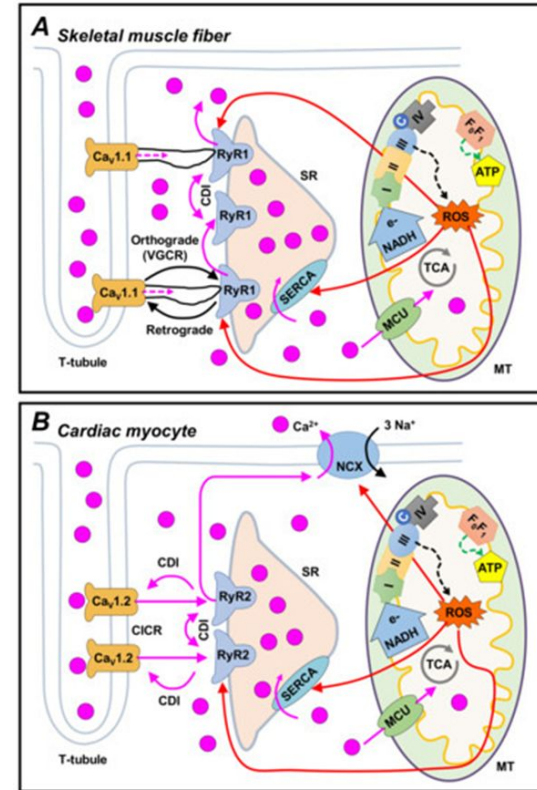
Fiziološke vloge: Širjenje akcijskega potenciala

- prenos akcijskega potenciala vzdolž aksona do živčnega končiča
- zaporedno odpiranje in zapiranje VGIC kanalov
- mielizirani aksoni:
 - Ranvierjeva vozlišča
 - skokovito prevajanje



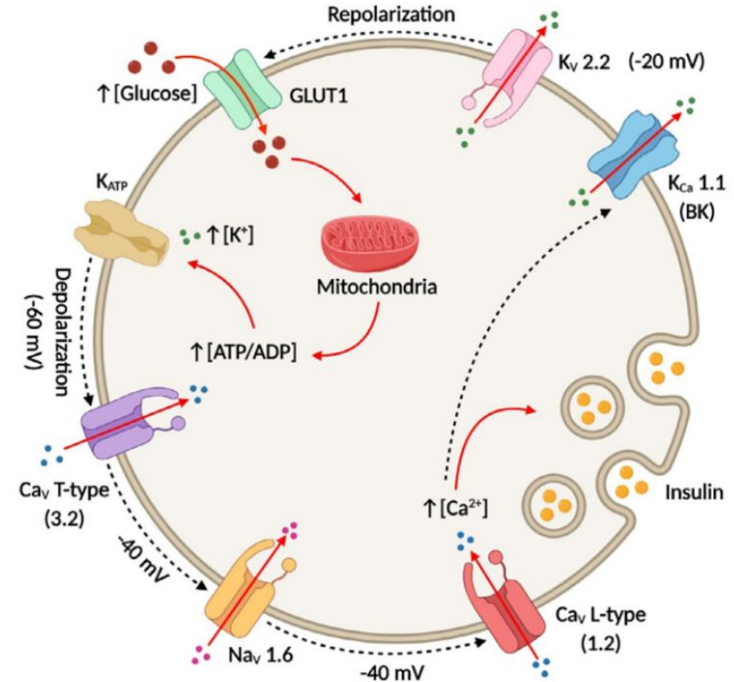
Fiziološke vloge: **Mišična kontrakcija**

- Cav kanali.
- izločanje acetilholina → odpiranje kationski kanalov mišičnih celic, vdor Na^+ .
- odprtje Nav kanalov → akcijski potencial.
- T-tubuli in sarkoplazemski retikulum.
- *skeletna mišica*: Cav1.1 – RyR1 (neposredna aktivacija).
- *srčna mišica*: Cav1.2 – RyR2 (aktivacija s Ca^{2+}).



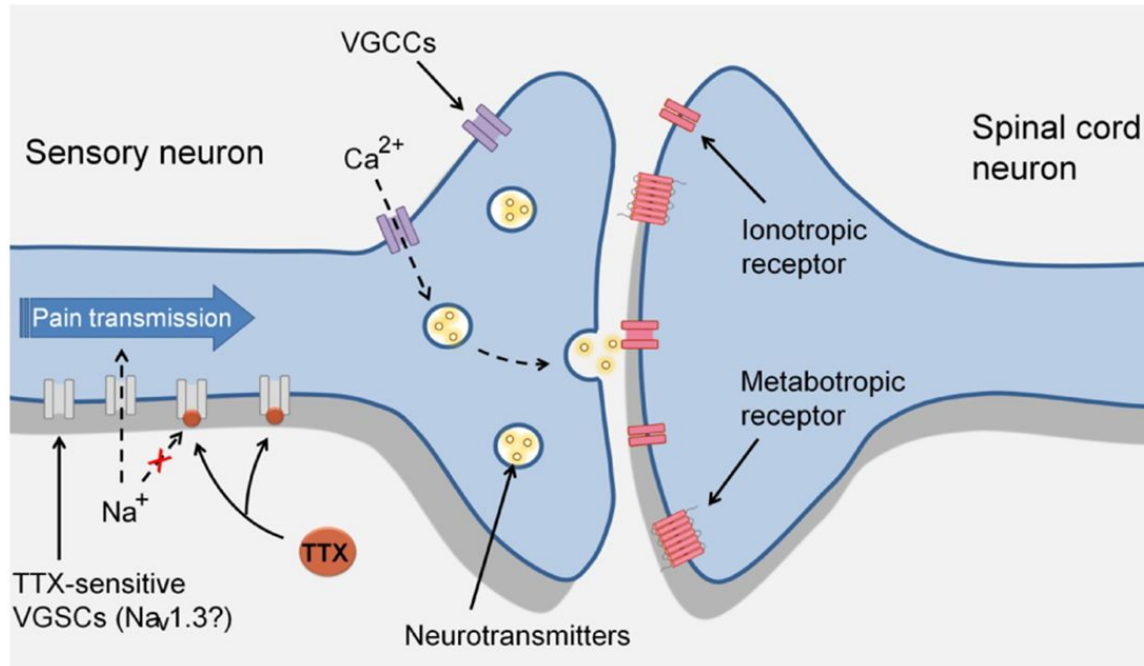
Fiziološke vloge: **Izločanje hormonov**

- inzulin iz β -celic trebušne slinavke:
 - višja koncentracija ATP $\rightarrow$ zaprtje KATP
 - depolarizacija membrane $\rightarrow$ odprtje Cav kanalov.
 - povečana koncentracija Ca^{2+} $\rightarrow$ eksocitoza inzulinskih zrn.
 - Nav kanali okrepijo depolarizacijo.
 - Kv kanali omogočijo repolarizacijo.

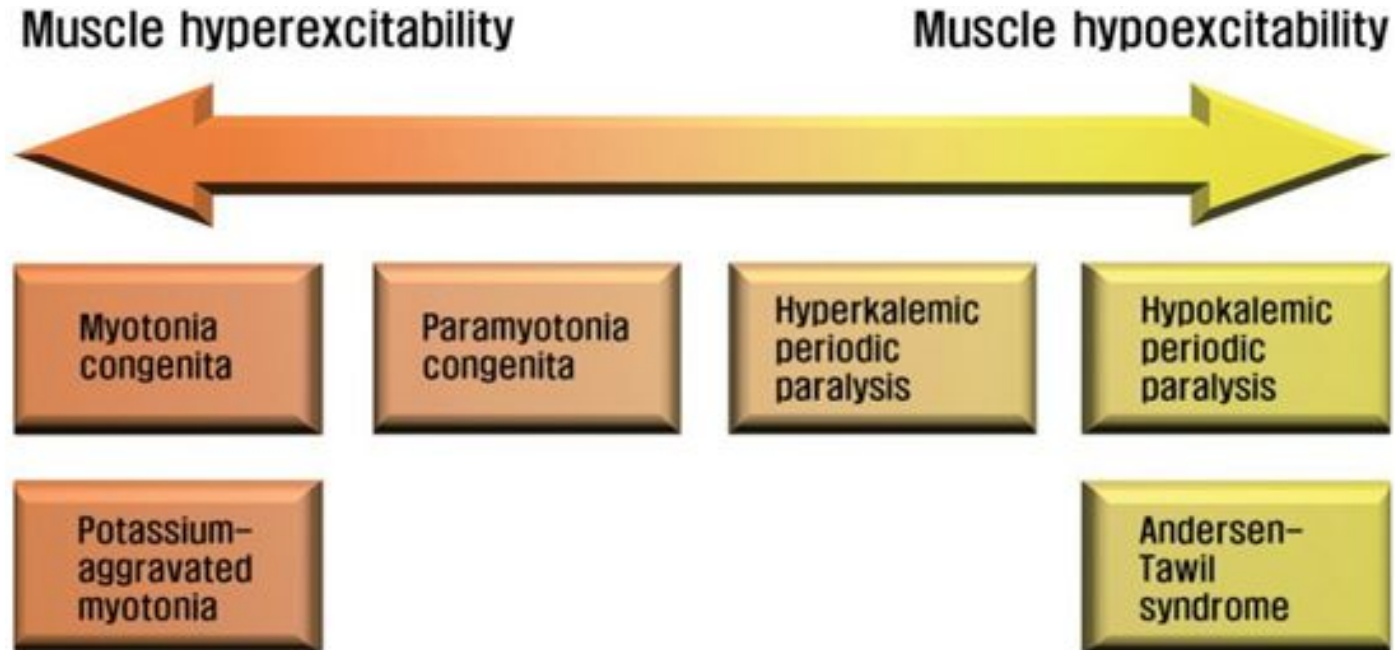


Fiziološke vloge: **Detekcija bolečine**

- napetostno-odvisni natrijevi kanali
- kronična bolečina



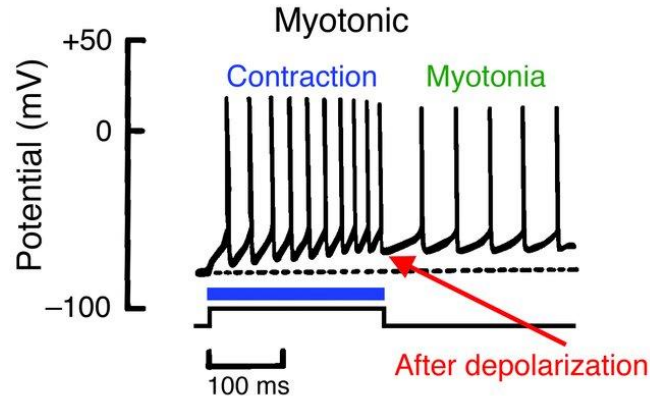
Patologija: **Kanalopatije skeletno-mišičnega sistema**



Patologija: **Kanalopatije skeletno-mišičnega sistema**

Kongenitalna miotonija

- loss-of-function mutacije gena CLCN1
- zmanjšani tok Cl^- ionov v celico
- spontano proženje AP
- upočasnjena repolarizacija



Hipokalemična periodična paraliza

- mutacije genov CACNA1S ali SCN4A
- nizke koncentracije serumskega K^+
- puščanje natrijevih/kalcijevih kanalov
- "paradoksalna" depolarizacija namesto hiperpolarizacije
- onemogočeno proženje AP

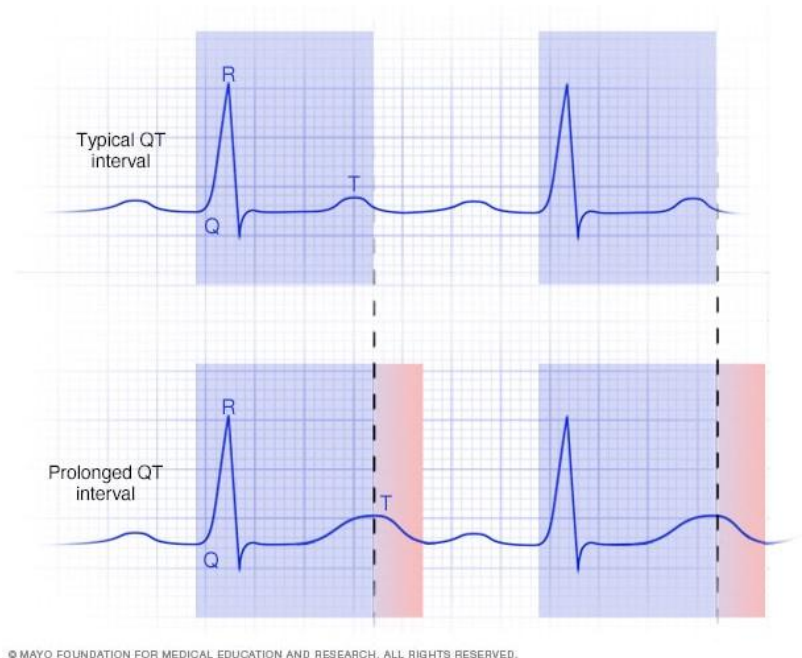
Patologija: **Kanalopatije kardio-vaskularnega sistema**

Sindrom dolgega intervala QT (LQTS)

- loss-of-function mutacije genov KCNQ1, KCNH2, KCNE1, KCNE2, KCNJ2, KCNJ5
 - zmanjšan tok skozi kanale Kr, Ks in Kir
 - ni terminacije AP → podaljšan QT interval
- gain-of-function mutacije genov CACNA1C, SCN5A, SCN4B
 - zakasnjeno zapiranje in inaktivacija kanalov
 - podaljšan tok ionov v celico → depolarizacija

Sindrom kratkega intervala QT

- loss-of-function mutacije kalcijevih kanalov
- gain-of-function mutacije kalijevih kanalov



Patologija: **Kanalopatije živčnega sistema**

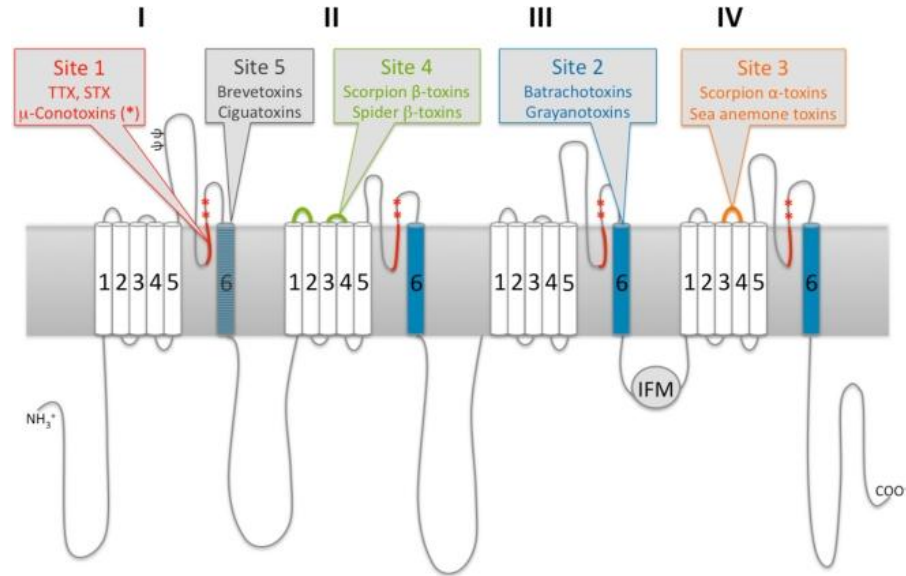
Dravetov sindrom

- SMEI = severe myoclonic epilepsy of infancy
- 900 mutacij gena SCN1A
 - večinoma drugačno-smiselne
- oslabljena inaktivacija kanala → povečana prepustnost za Na⁺ ione
- zmanjšan aktivacijski prag vzdražnih nevronov → povečana vzdražljivost
- dolgotrajna depolarizacija membrane → manjša vzdražnost inhibitornih nevronov

Patologija: **Vpliv toksinov na natrijeve kanale**

Vezavno mesto 1:

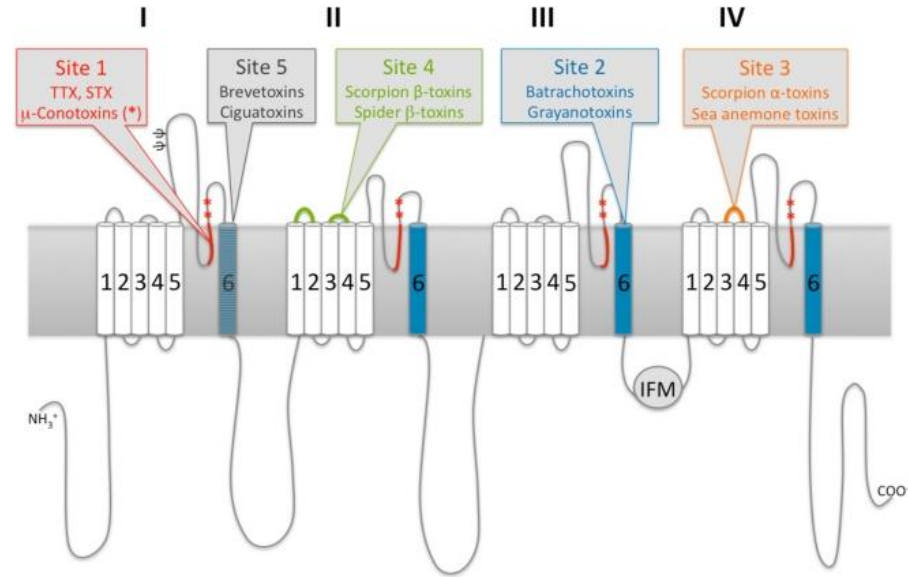
- blokada pore
- TTX in STX imata pozitivno nabito gvanidinsko skupino → interakcija π -kation med Tyr v domeni I in gvanidinsko skupino → stabilizacija v določenih tipih natrijevih napetostno-odvisnih kanalov
- lokalni anestetiki (lidokain), anti-aritmitiki, anti-epileptiki



Patologija: **Vpliv toksinov na natrijeve kanale**

Vezavno mesto 2:

- aktivno stanje
- interakcija s TM segmentom IVS6 → alosteričen mehanizem
- inhibicija inaktivacije kanalov → ves čas aktivirani kanali (tudi pri MMP)
- aktivacija se pomakne k bolj negativnim vrednostim potenciala
- podobno pri vezavi na mesto 5



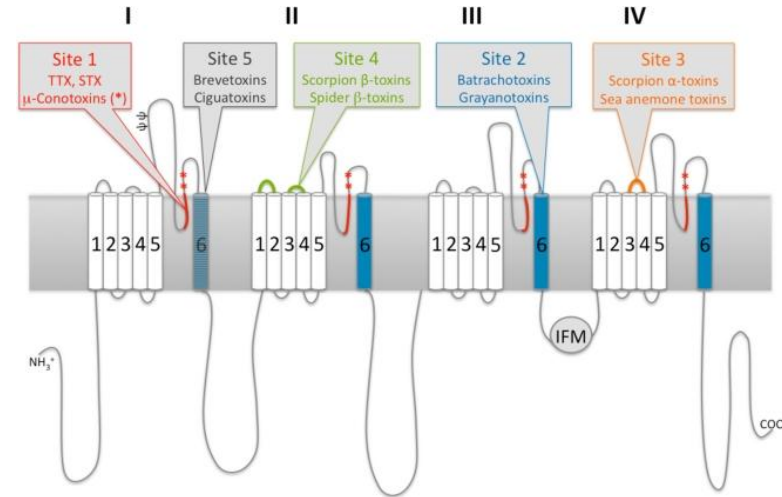
Patologija: **Vpliv toksinov na natrijeve kanale**

Vezavni mesti 3 in 6:

- nevrotoksin zaklene konformacijo segmenta IVS4 (napetostnega senzorja)
- upočasni se inaktivacija kanala

Vezavno mesto 4:

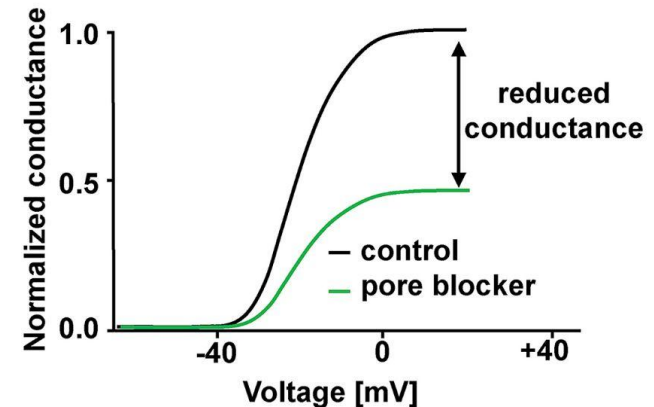
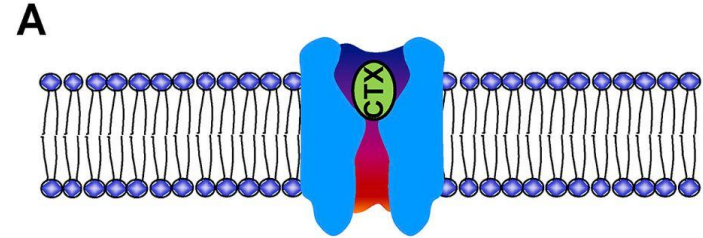
- med depolarizacijo se zunajcelični del segmenta IIS4 obrne ven → dostopni ak ostanki zanke S3-S4
- nevrotoksin stabilizira aktivno konformacijsko stanje segmenta IIS4
- premik napetostno-odvisne aktivacije kanalov v smer hiperpolarizacije
- manjša max. amplituda toka natrijevih ionov



Patologija: **Vpliv toksinov na kalcijeve kanale**

Blokada pore:

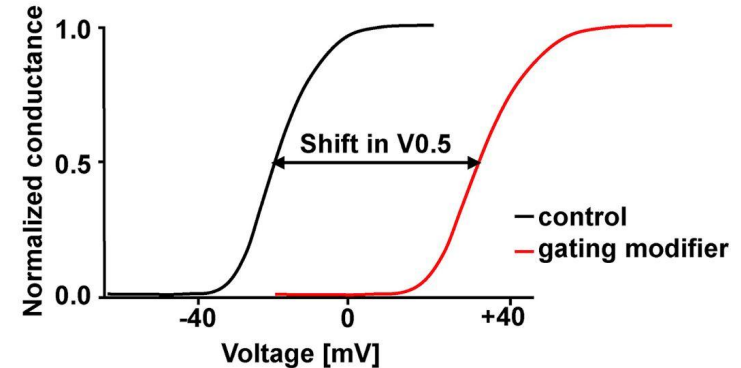
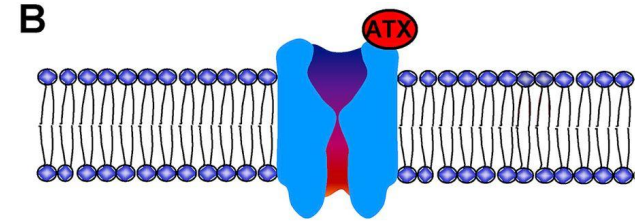
- najbolj okarakterizirani ω -konotoksini iz morskih polžev rodu *Conus*
 - blokada kalcijevih kanalov tipa N
 - najbolj selektiven GVIA
 - manj selektiven, hitrejša disociacija MVIIA → zdravilo za lajšanje bolečin zikonotid (Prialt)



Patologija: **Vpliv toksinov na kalcijeve kanale**

Inhibicija odpiranja kanala in vstopa kalcija:

- ω -agatoksini iz strupa ameriškega lijakastega pajka *Agelopsis aperta*
- ω -gramotoksin SIA iz strupa tarantele *Grammostola spatulata*



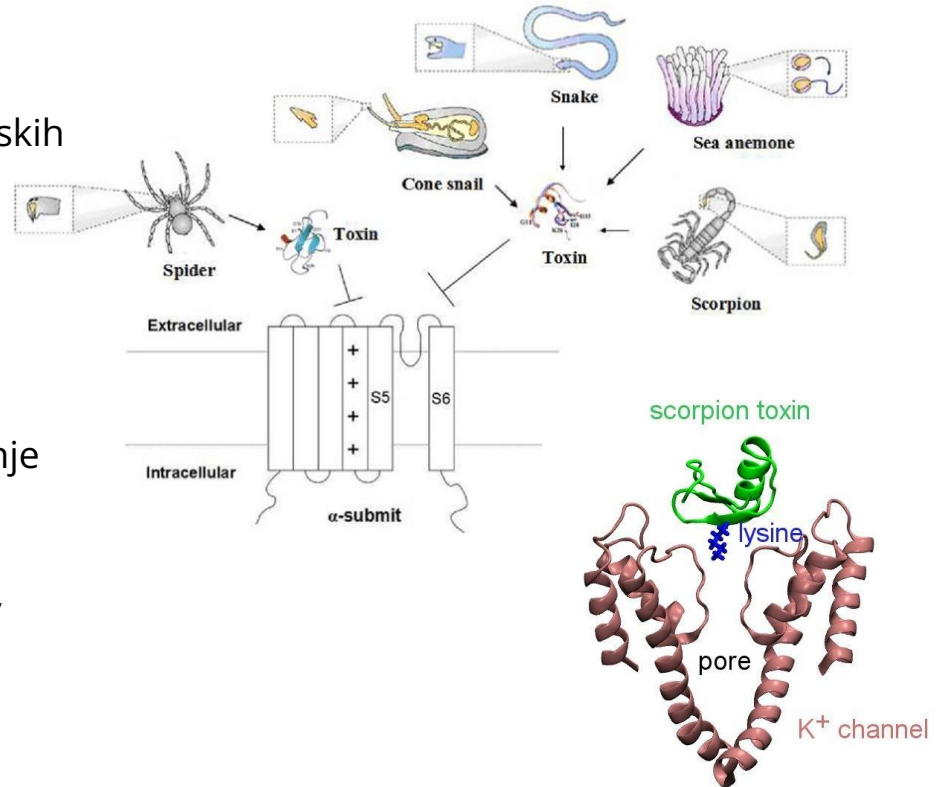
Patologija: **Vpliv toksinov na kalijeve kanale**

Blokada pore:

- toksini iz škorpionov, morskih vetrnic, morskih polžev in kač
- preko Lys se vežejo v žep → fizična blokada

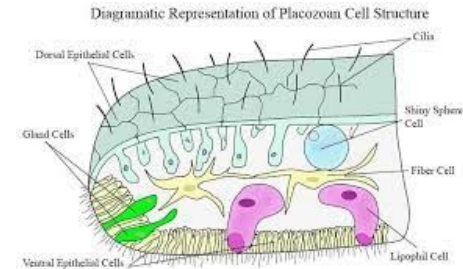
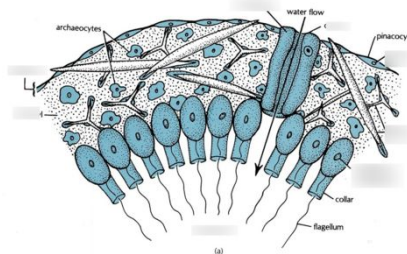
Vpliv na napetostno-senzorsko domeno:

- toksini iz pajkov
- stabilizacija zaprtega stanja → težje odpiranje kanala
- destabilizacija odprtega stanja
- nekaj ak-ostankov se nespecifično zasidra v membrano



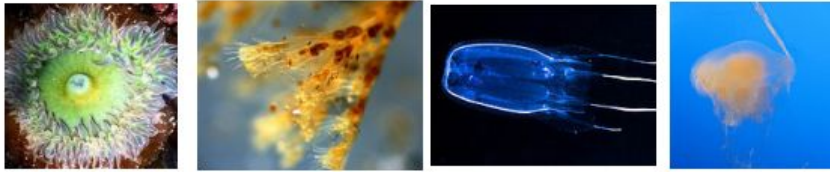
Evolucija napetostno-odvisnih ionskih kanalov

- bakterije, Arheje in Evkarionti
- pred pojavom večceličnih organizmov
- bičkarji ovratničarji (*Monosiga brevicollis*)
 - homologne domene Kv, Cav, Nav
 - osnovni gradniki celične ekscitabilnosti
 - uravnavanje intracelularnega Ca v cilijah in bičkih
- spužve in plakozoe
 - primitivna celična komunikacija
 - kontraktilnost (cilije, kontraktilni proteini)



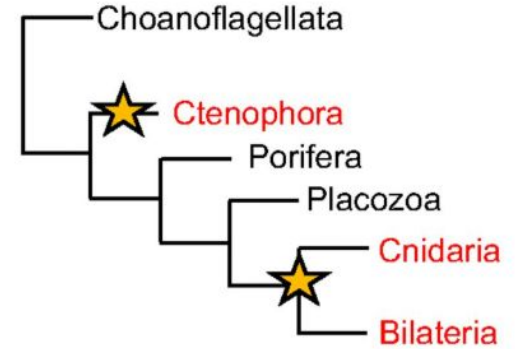
Evolucija napetostno-odvisnih ionskih kanalov

- ožigalkarji
 - neuropeptidno izražanje
 - nevromuskularna povezava
 - kontrakcije, primiki, odzivi na dotik



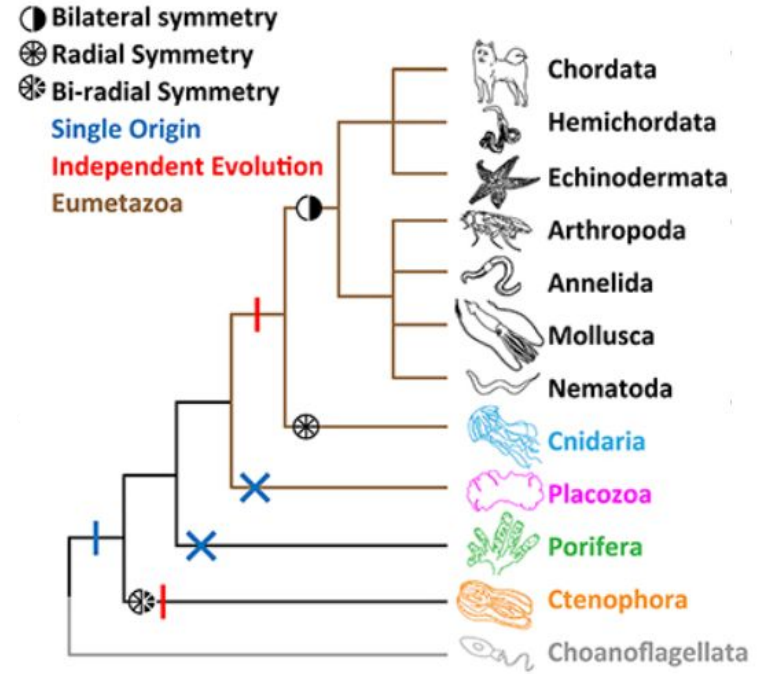
- rebrače
 - konvergentna evolucija
 - natrijevi kanali s selektivnimi filtri

Morozet et al., 2014



Evolucija napetostno-odvisnih ionskih kanalov

- toksičnost Ca^{2+} ionov in nagib k uporabi Na^{+} ionov
- dvoj zaporednih podvojenj endomembranskih proteinov
 - I + III in II + IV
 - $\text{Cav} \rightarrow \text{Nav}$
- dve celogenomski podvojitvi pri vretenčarjih
 - iz štirih izoform v 8, in nato v 10
 - raznolikost Cav , Nav in Kv
 - hitrost aktivacije/inaktivacije
 - interakcije z regulacijskimi podenotami
 - specializirane živčne in mišične funkcije



Evolutivna: **Natrijevi kanali**

- najstarejši napetostno-odvisni ionski kanali
- enodomenski 6TM-kanali
 - domena s poro (selektivno za K^+ ione)
 - napetostno občutljiva domena (S1-S4)
- prokarionti
 - arheja *Aeropyrum pernix*
 - bakterija *Listeria monocytogenes*
- Enocelični evkarionti
 - koanoflagelat *Monosiga brevicollis*
- Plakozoe, Rebrače

```

Nkv1.2      SFELIVRRFLAACK--PSKAGFETNMIMNIDIVAIIPYFILTGLTLEAEK-----ED   280
Shaker      TELFELIVRRFLAC--SNHLKNERDQVMVMDIVAIIPYFILTVAVEEEDITNLKPAPKVSQ   340
Takv XP_002114266.1 TFYEVVRFLLSS--PNKQWQGLKGLLIADLTLPFYINLAJAINRIQQTDVNN-----ST   285
Takv XP_002107932.1 TQFVIVRHFAVC--PDPRYFRFSFMNLIDDLAILPFYINLARSVQVLVTFs      285
Takv XP_002117304.1 TLFELIIRFLAC--PSKWKVFVSPMNIIDFLAMPYVYITLIMRTNGPN      237
ML00442Ia   SLDFFVVRLLLC--DKDKTFLTSLMWNIDFLSLPFYINLAINRITPEGT      275
ML18152a    TVELVARFCAK--PNKKEFWKSIINWIDDLAALTLPFYISLMPVRDQD      274
ML049627a   TEFELIIRVISC--PKDLQFCKGILINIDLTILPFYVTLTLQNEALRD      233
MbKv XP_001746676.1 TRIYGMRFYAGPTRLTKWMEPMNLIDDLAILPYYIIGLGLNSSGAS-----   383
::          : : * * : : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

```

```

mkv1_2      AQQGQQQAMS LAILRVILRVLRVFRIFKLSRRHSGI QILGQTQKASMRLEGLLFFLFITGV 340
Shaker      DKSSNQAMSL LAILRVILRVVRVFRIFKLSRRHSGI QILGQTQKASMRLEGLLFFLFITGV 348
TaKv XP_002114266.1 EDFKIGBGAQKSVLLRLMLRVLRVLRILARRHSGI QILGTLTKKSNWLEFLNALLFTITGV 295
TaKv XP_002107932.1 -----VIFRFRVLRLVLRILKSKLKHGLT KILYHTLTKSSMRLEGLLVIFVTQVL 340
TaKv XP_002117304.1 -----NVTITVEALRVLRVLRARIFKLSRRHSGI QTLGKTLTKASMEFLMLCGILVTCV 292
ML004421a   -----IDALMTLVRLTLRVLRILARIFKMSRRFDG FALGVALRTGASNELTLVLLVLTTCV 328
ML18152a    -----LQSVIFRMIRTRIFRIFKMSRRFAGI LALVALARAGSRELAFLPLLSCV 285
ML0049627a -----SFVVLRVLRVLRVFRIFKLSRRHSGI TLTGLALRASLRELAFLFFLLITGV 328
MbKv XP_001746676.1 -----SVAVVRILRLTRISRLKFSRRHSGI QDMIVICSSKSKLEVLVLLFITIVAAT 435

```

[illegible]

- zaporedne duplikacije genov za enodomenske predhodnike
- postopno združevanje domen

Morska vetrnica
Nematostella vectensis

44 genov za Kv

Družina genov Shaker (20)



Hidre
Hydra vulgaris

35 genov za Kv



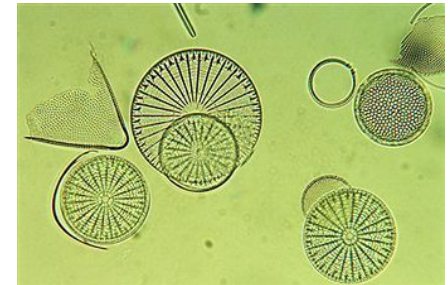
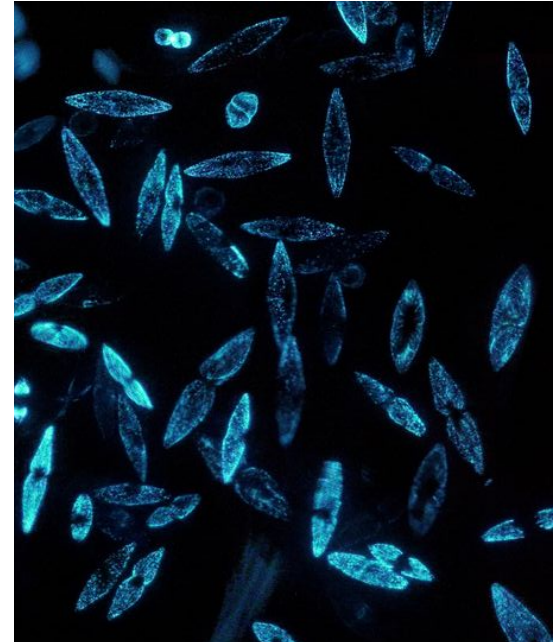
Spužve (Porifera)

Večinoma izgubljeno, le geni za
napetostno-neodvisne kalijeve
kanale



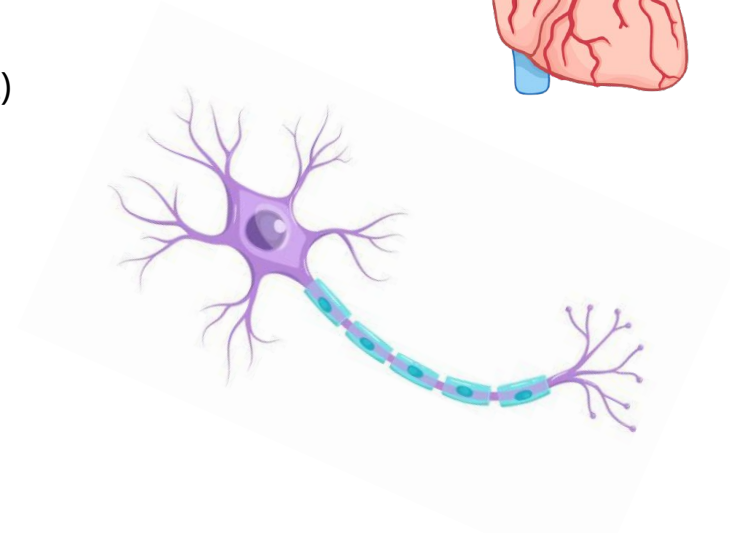
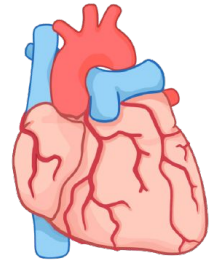
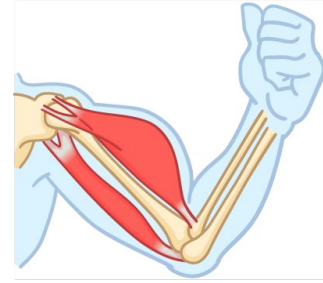
Evolucija: **Kalcijevi kanali**

- stara, a redko prisotna družina ionskih kanalov
- številni prokarionti
- protisti
 - ciliati (*Paramecium*), alge (*Chlamydomonas*), diatomeje, dinoflagelati
 - stresni odzivi, infekcije, bioluminiscenca in gibanje
- alternativni mehanizmi za vnos kalcija (ligandsko-odvisni ali TRP kanali) - protisti in glive
- pomembnost pri živalih
 - aktivacija ob depolarizaciji membrane, vstop Ca^{2+} ionov uravnava sproščanje nevrotransmitorjev, transkripcijo genov, aktivacijo od Ca^{2+} odvisnih encimov



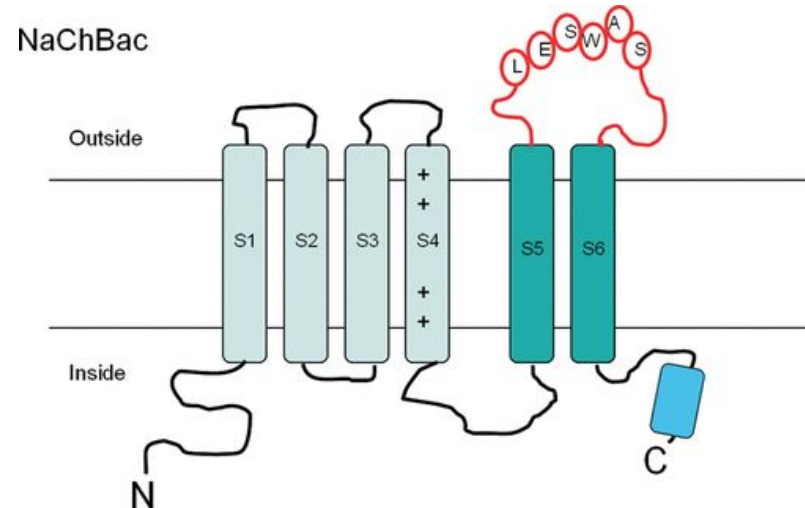
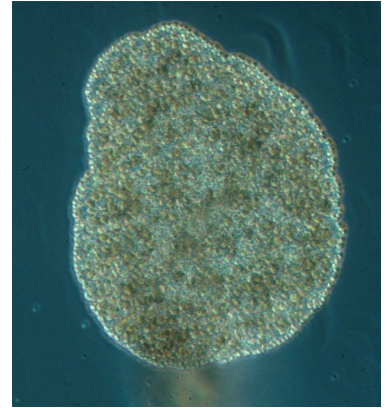
Evolucija: **Kalcijevi kanali**

- kanali z visokim pragom aktivacije (Cav1 in Cav2)
- kanali z nizkim pragom aktivacije (T-tip ali Cav3)
- bičkarji ovratničarji - oba tipa
- spužve, rebrače brez T-tipa
- ožigalkarji, vretenčarji - podvajanje Cav genov
 - ožigalkarji 6 Cav genov (stabilno že 500 milijonov let)
 - vretenčarji 10 Cav kanalov - večja raznolikost



Evolucija: **Natrijevi kanali**

- začetek in širjenje električnega signala v živčnih celicah
- visoko konzervativen filter (Asp-Glu-Lys-Ala)
- bakterije
 - NaChBac, podoben selektivni filter
- homologi enoceličnih evkariontov (bičkarji ovratničarji)
 - *Thecamonas trahens*
 - *Monosiga brevicollis*
- plakozoa (rod *Trichoplax*)
- rebrače (rod *Mnemiopsis*)
- ni homologov pri spužvah



Evolutivna: **Natrijevi kanali**

- Nav2 kanali
 - predniki metazoj (plakozoji, rebrače, koanoflagelati, ožigalkarji, tudi črvi)
 - ni izrazite selektivnosti (tudi Ca^+ ioni)
- Nav2.5 kanali
 - le ožigalkarji
 - podtip Nav2
 - včasih prevaja tudi Ca^+ ione
 - predoh splošnih kanalov v specializirane
- Nav1 kanali
 - dvojna podvojitev genov za Nav2 kanale
 - bilateralne živali
 - hitri akcijski potenciali
 - specifični za Na^+ ione
 - žuželke, gliste, vretenčarji

