

Napetostno-odvisni ionski kanali

Seminarska naloga pri izbirnem predmetu Biološke membrane

Študentje:

Leila Bohorč

Gal Kastelic

Mia Kobal

Suzana Kučuk

Pia Trošt

Maj 2025

Kazalo

1.	Uvod.....	3
1.1.	Tipi VGIC	3
1.2.	Zgradba VGIC	4
1.3.	Gating mehanizmi (odpiranje in zapiranje kanalov).....	5
2.	Struktura in mehanizem delovanja napetostno-odvisnih ionskih kanalov.....	5
2.1.	3D struktura	5
2.2.	Ionska selektivnost in permeabilnost	6
2.3.	Mehanizem delovanja VGIC	7
2.4.	Inaktivacija VGIC	7
3.	Fiziološka vloga napetostno-odvisnih ionskih kanalov	9
3.1.	Akcijski potencial nevronov	9
3.2.	Širjenje akcijskega potenciala (prevajanje živčnega impulza)	10
3.3.	Mišična kontrakcija.....	10
3.4.	Druge vloge VGIC kanalov	11
4.	Patologija napetostno-odvisnih ionskih kanalov	12
4.1.	Kanalopatije	12
4.2.	Vpliv toksinov.....	13
4.3.	Vpliv toksinov na natrijeve kanale	13
4.4.	Vpliv toksinov na kalcijeve kanale	14
4.5.	Vpliv toksinov na kalijeve kanale.....	14
5.	Evolucija napetostno-odvisnih ionskih kanalov	14
5.1.	Evolucija napetostno odvisnih kalijevih kanalov	15
5.2.	Evolucija napetostno-odvisnih kalcijevih kanalov	15
5.3.	Evolucija napetostno-odvisnih natrijevih kanalov.....	16
6.	Literatura.....	17

1. Uvod

Živčni sistem predstavlja enega najbolj kompleksnih in natančno uravnanih komunikacijskih omrežij v človeškem telesu. Osnova hitre in učinkovite signalizacije, ki jo ta sistem ima, so bioelektrični signali – akcijski potenciali – ki jih uravnavajo posebni proteinski kanali, vgrajeni v celične membrane. Med njimi so ključni napetostno odvisni ionski kanali (*Voltage-Gated Ion Channels*, VGICs), ki zaznavajo spremembe električnega potenciala membrane in se glede na to odpirajo ali zapirajo, kar posledično omogoča selektivni prehod ionov skozi membrane [1]. S tem omogočajo pretok specifičnih ionov (najpogosteje Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ali Cl^-) skozi plazemsko membrano živčnih celic, kar predstavlja temelj živčne aktivnosti, mišične kontrakcije, hormonske signalizacije in številnih drugih procesov [2].

Funkcija teh kanalov presega le osnovno električno signalizacijo ker le ti sodelujejo pri razvoju živčnega sistema, uravnavanju izražanja genov, modulaciji sinaptične plastičnosti in integraciji senzornih signalov [2]. Njihova fiziološka funkcija je tako bistvena, da že manjše spremembe v njihovi zgradbi ali izražanju lahko povzročijo resne motnje, kot so epilepsija, aritmije in genetski sindromi, povezani z razvojnimi zamudami [1].

1.1. Tipi VGIC

VGIC kanale običajno razvrščamo glede na ionsko selektivnost in funkcionalno vlogo v celici. Med najpomembnejše sodijo:

a) Natrijevi kanali (Nav)

Napetostno odvisni natrijevi kanali (Nav) so 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 [1]. Na primer, Nav1.5 prevladuje v srčni mišici in je ključen za nastanek srčnega akcijskega potenciala [3]. Njihova glavna funkcija je omogočiti hiter in selektiven vstop Na^+ ionov v celico, in sicer takrat, ko membranski potencial doseže določeni prag. Sestavljeni so iz velike α -podenote, ki tvori poro kanala, in ene ali več pomožnih β -podenot, ki vplivajo na kinetiko, površinsko izraženost in lokalizacijo kanala. α -podenota vsebuje štiri domene (DI – DIV), pri čemer vsaka domena vključuje šest transmembranskih segmentov (S1 – S6). Segment S4 znotraj vsake domene vsebuje pozitivno nabite ostanke arginina ali lizina, ki delujejo kot napetostni senzorji. Ko pride do depolarizacije, se ti segmenti premaknejo navzven in sprožijo konformacijsko spremembo, ki odpre poro Nav kanala [3, 4].

b) Kalijeve kanali (Kv)

Kv kanali omogočajo selektivni iztok K^+ ionov iz celice, kar prispeva k repolarizaciji membrane po akcijskem potencialu. Vsak kanal je sestavljen iz štirih podenot, ki vsaka vsebuje šest transmembranskih segmentov (S1–S6) [1]. Obstajajo številne družine Kv kanalov, od Kv1 do Kv12, ki sodelujejo pri nastanku ritmične aktivnosti in se nahajajo v različnih delih telesa kot so mišice, srce in možgani. Nekateri kanali se hitro aktivirajo in hitro inaktivirajo (npr. kanali tipa A), drugi pa se aktivirajo počasi in sodelujejo pri vzdrževanju membranskega potenciala [5]. 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 [6].

c) Kalcijeve kanali (Cav)

Napetostno odvisni kalcijevi kanali (Cav) uravnavajo vstop Ca^{2+} ionov v celico kot odziv na depolarizacijo membrane. Kalcijevi ioni imajo vlogo sekundarnega prenašalca v številnih znotrajceličnih signalnih poteh in so ključnega pomena za sproščanje nevrottransmiterjev, krčenje mišic, izražanje genov in druge procese [1]. Strukturno je Cav kanal sestavljen iz velike $\alpha 1$ -podenote, ki tvori poro in določa tip kanala, ter pomožnih podenot: $\alpha 2\delta$, β in γ . $\alpha 2\delta$ povečuje površinsko ekspresijo kanala, β stabilizira $\alpha 1$ podenoto in modulira njeno aktivacijo, γ pa ima bolj omejeno, a še vedno pomembno regulativno vlogo [7].

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
- Disfunkcija Cav kanalov je vključena v številne bolezni, kot so epilepsije, srčne aritmije itn. Na primer, mutacija v Cav1.2 povzroči Timotejev sindrom: srčna aritmija z razvojnimi nepravilnostmi in motnjami avtističnega spektra. Zaradi njihove vloge v sinaptičnem prenosu so tudi tarča številnih nevrotoksinov in zdravil [7].

d) Kloridni kanali

Napetostno odvisni kloridni kanali (Cl^- kanali) so manj raziskani kot Nav, Kv in Cav kanali, vendar imajo pomembne funkcije pri vzdrževanju celičnega volumna, pH in transportu anionov v epitelih tkivih [1]. 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, temveč njihova napetostna odvisnost izhaja iz elektrostatičnih interakcij ionov z vezavnimi mesti znotraj por. Med najpomembnejšimi člani družine je CLC-1, ki je ključni kloridni kanal v skeletnih mišicah in pomembno prispeva k repolarizaciji membrane po mišični kontrakciji. Drugi član, CLC-2, pa je izražen v epiteljskih tkivih, možganih in testisih, kjer se aktivira ob hiperpolarizaciji membrane ter sodeluje pri uravnavanju celičnega volumna in ionskega ravnovesja. CLC-5 in CLC-7 sta antiporterja, ki izmenjujeta Cl^- in H^+ ione ter tako omogočata zakisanje notranjih organelov, kot so endosomi in lizosomi [8].

1.2. Zgradba VGIC

Osnovna enota funkcionalnega VGIC kanala je podenota z več transmembranskimi segmenti, ki se sestavljajo v homo- ali heterotetramerne strukture, odvisno od vrste kanala [1].

- Transmembranski segmenti (S1–S6): Vsaka α -podenota VGIC kanala vsebuje šest transmembranskih α -heliksni segmentov, označenih od S1 do S6. Segmenti S1 – S4 sestavljajo t. i. napetostno senzorsko domeno (VSD), ki zaznava spremembe v membranskem potencialu. Najpomembnejši je segment S4, ki vsebuje ponavljajoče se pozitivno nabite aminokisline (arginin ali lizin), ključne za napetostno občutljivost. S5 in S6 skupaj z medsegmentno zanko tvorita osrednjo ionsko poro, skozi katero potekajo ioni, ko je kanal odprt [1, 7].
- Selektivni filter: Med segmentoma S5 in S6 se nahaja zanka, imenovana P-zanka (pore loop), ki vstopa v membrano in oblikuje ionski selektivni filter. Ta filter določa, kateri ioni lahko prehajajo skozi kanal. Selektivni filter je ključnega pomena za funkcionalno

diferenciacijo med različnimi tipi VGIC kanalov (Nav, Kv, Cav), saj natančno določa njihovo ionsko specifičnost [7].

- Pomožne podenote: Funkcionalnost VGIC kanalov je pogosto modulirana s pomočjo dodatnih, neprevodnih podenot, ki se vežejo na osnovno α -podenoto. Na primer, pri napetostno odvisnih natrijevih kanalih (Nav) so pomembne β -podenote, ki vplivajo na kinetiko odpiranja in zapiranja, pa tudi na membransko lokalizacijo kanala [1].
- 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. Te domene omogočajo kompleksno regulacijo kanalov – preko fosforilacije s protein kinazami, vezave signalnih molekul (npr. kalmodulin) ali interakcije z znotrajceličnimi proteini, ki vplivajo na stabilnost, lokalizacijo in prepustnost kanalov [1].

1.3. Gating mehanizmi (odpiranje in zapiranje kanalov)

VGIC kanali se odpirajo in zapirajo preko natančno usklajenih mehanizmov, glede na spremembe membranskega potenciala:

- Aktivirano stanje: Ob depolarizaciji membrane se S4 segmenti pomaknejo proti zunanosti membrane, kar povzroči konformacijsko spremembo, ki vodi do odprtja ionske pore. Ta proces traja le nekaj milisekund in je bistven za hitro električno signalizacijo [1].
- Inaktivirano stanje: Po odprtju kanal pogosto hitro preide v stanje inaktivacije, kar preprečuje nadaljnji pretok ionov. Pri Nav kanalih se to zgodi preko "ball-and-chain" mehanizma, kjer del proteina zapre poro s citoplazemske strani [1]. Inaktivacija je bistvena za enosmerno širjenje akcijskega potenciala [2].
- Deaktivirano (počivajoče) stanje: Ko se membrana repolarizira, se S4 segmenti vrnejo v prvotno stanje in kanal se zapre. Po določenem časovnem intervalu (reaktivacijska faza) kanal ponovno postane pripravljen za aktivacijo [1].

2. Struktura in mehanizem delovanja napetostno-odvisnih ionskih kanalov

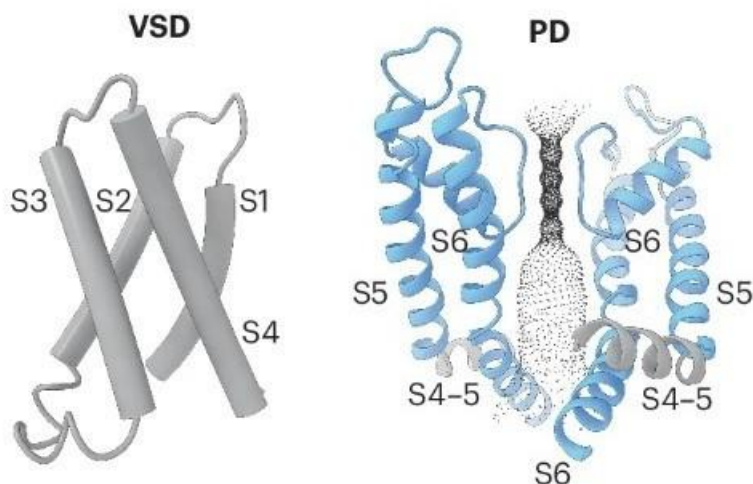
2.1. 3D struktura

VGIC imajo značilno zgradbo, sestavljeno iz štirih transmembranskih domen, razporejenih okoli osrednje pore, kar ustvarja štirikratno ali psevdosimetrijo glede na os pravokotno na membrano. Pri Nav in Cav kanalih so vse štiri domene združene v eni sami α -podenoti, medtem ko Kv kanale sestavljajo štiri ločene podenote, od katerih vsaka prispeva eno domeno. Poznani sta dve osnovni obliki sestave podenot:

- Domensko-zamenjana (*domain-swapped*): VSD iz ene ponovitve se povezuje s poro sosednje ponovitve. Taka arhitektura je značilna za večino Kv kanalov.
- Nedomensko-zamenjana (*non-swapped*): VSD sodeluje neposredno s pripadajočim segmentom pore. Tak način organizacije je značilen za nekatere Cav in Nav kanale [1].

Segmenti S6 se zložijo v snop štirih vijačnic (tetrahelikalni snop), ki je na citosolnem robu membrane zasukan, kar pri pogledu s strani ustvarja obliko črke V. Točka, kjer se stikajo štiri S6 vijačnice, predstavlja spodnja oziroma aktivacijska vrata kanala. Segment S5 poteka skoraj

vzporedno s S6 znotraj iste ponovitve in tvori neprekinjeno zunanjo steno pore. Del med segmentoma S4 in S5 pogosto oblikuje prečno vijačnico S4–S5, ki je značilna za »domensko-zamenjano« arhitekturo (slika 1) [1–3].



Slika 1: Strukturna organizacija transmembranskih segmentov VGIC. Levo: Napetostno senzorska domena (VSD), sestavljena iz štirih transmembranskih heliksov (S1–S4). Desno: Porna domena (PD), ki vključuje helikse S5 in S6 ter povezovalni heliks S4–S5 [1].

2.2. Ionska selektivnost in permeabilnost

V VGIC se segment med S5 in S6 zloži v strukturo, ki jo sestavljata dve vijačnici s selektivnim filtrom vmes. Pri Nav in Cav kanalih sta ti vijačnici poimenovani P1 in P2, pri čemer se P2 nahaja na zunajcelični strani membrane. Pri Kv kanalih pa vijačnica P2 ni prisotna. Namesto nje se pojavi zanka (P-zanka), ki se nahaja tik pred segmentom S6 in poteka skoraj vzporedno z zunanjim delom celične membrane [4, 5].

Selektivnost ionskih kanalov je določena z več dejavniki: velikost iona, gostota naboja in prisotnost hidratacijskega ovoja. Ti dejavniki skupaj vplivajo na to, kako dobro ion ustreza selektivnemu filtru kanala.

- Selektivni filter Kv kanalov tvori zaporedje aminokislin TVGYG. Znotraj tega predela ioni izgubijo hidratacijskih ovoj, saj ga nadomeščajo interakcije s karbonilnimi kisiki – ustvarijo stabilno okolje, v katerem se dehidrirani K^+ ioni lahko vežejo. Manjši ioni, kot je Na^+ , ne morejo vzpostaviti enako stabilnih interakcij. Ker so energijske ovire med posameznimi mesti nizke, in ker obstaja ravnotežje med privlačnimi interakcijami kanal–ion ter odbojnimi interakcijami ion–ion, lahko K^+ ioni hitro potujejo skozi kanal po skoraj ravni poti [2, 6].
- Cav kanali omogočajo prevodnost različnim kationom, vendar kažejo izrazito selektivnost za Ca^{2+} . Meritev prevodnosti pri L-tipih Ca^{2+} kanalov je pokazala naslednje zaporedje prevodnosti: $Ca^{2+} < Ba^{2+} < Li^+ < Na^+ < K^+ < Cs^+$. Kljub temu pa Ca^{2+} učinkovito blokira Na^+ , tudi ko je razmerje koncentracij zgolj 1:1.000 v korist natrija – kar kaže na izjemno visoko selektivnost. Ključ do te selektivnosti je EEEE ali EEDD motiv – po en ostanek iz vsake od štirih ponovitev. Ti ostanki tvorijo filter, ki omogoča selektivno prehajanje Ca^{2+} ionov. Da bi pojasnili, kako lahko kanal hkrati kaže nizko prevodnost in visoko selektivnost, je bil predlagan model z dvema vezavnima mestoma.

Zgornje mesto (S1) tvorijo karboksilatne skupine iz EEEE ali EEDD motiva. Spodnje mesto (S2) pa obdaja osem karbonilnih kisikov iz dveh aminokislin, ki so neposredno pred EEEE/EEDD motivom [1, 4].

- Za razliko od Kv in Cav kanalov, kjer vsaka ponovitev prispeva enak aminokislinski ostanek, je selektivni motiv v Nav kanalih sestavljen iz štirih različnih aminokislin DEKA, po ena iz vsake ponovitve. Med temi ima lizin ključno vlogo – omogoča visoko selektivno prepustnost za Na^+ ione in hkrati preprečuje prehod Ca^{2+} ionov pri fizioloških pogojih. Analiza s simulacijami molekulske dinamike (MDS) je pokazala obstoj vezavnega mesta za Na^+ ion, ki ga tvorita Asp in Glu iz DEKA motiva ter še en ohranjen glutamat na začetku P2 heliksa v drugi ponovitvi – to so poimenovali DEE mesto. Ena izmed hipotez je, da Lys⁺ tvori solni mostiček z Glu. Ko Na^+ ion prehaja skozi selektivni filter, ga koordinirata Glu in Lys – slednji pa se med tem deprotonira, kar omogoča njegov premik z ionom do osrednjega kanala, kjer se nato ponovno protonira [1, 7].

2.3. Mehanizem delovanja VGIC

Nihanja membranskega potenciala povzročajo strukturne spremembe v VGIC, kar imenujemo elektromehanska sklopitev (EMC). V VSD je ključni element S4 segment, ki vsebuje ponavljajoče se pozitivno nabite ostanke (najpogostejše Arg ali Lys). Ti delujejo kot senzorji napetosti – v polariziranem stanju (ko je notranost membrane negativna) so usmerjeni navznoter, v depolariziranem stanju pa se pomaknejo navzven, kar predstavlja preklap iz deaktiviranega v aktivirano stanje. V skoraj vseh določenih strukturah VSD-jev večina transmembranskega dela segmenta S4 obstaja v obliki 3_{10} vijačnice – vsak zavoj ima tri aminokisliline. Posledično so nabiti ostanki (*gating charges*) poravnani na eni strani vijačnice in usmerjeni proti notranjosti VSD-ja [1, 8].

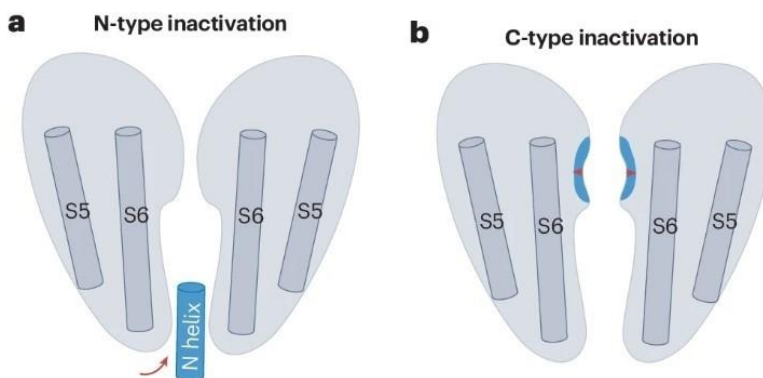
Ključ za elektromehansko sklopitev je prenos konformacijskih sprememb v VSD domenah na strukturne spremembe v poro kanala. V skoraj vseh znanih strukturah VGIC kanalov ostaja t. i. »ramenski« del pore – vključuje porne helikse ter segmente S5 in S6 – skoraj nespremenjen. Ta del tvori najbolj stabilno jedro kanala. V Nav kanalih je to jedro dodatno stabilizirano z dvema disulfidnima vezema med heliksoma P2 in S6. Za prenos konformacijskih sprememb iz VSD na poro je ključna struktura S4–S5 heliks. Ta povezuje segment S4 v VSD z delom S5 v poro – znotraj iste ponovitve. Pri »domain-swapped« VGIC pa ta heliks interagira s S5 in S6 v sosednji ponovitvi. Štirje taki heliksi skupaj tvorijo obroč, ki obdaja notranja vrata ionske pore in uravnava njeno odprtost [1, 5].

2.4. Inaktivacija VGIC

VGIC kanali lahko preidejo v inaktivirano stanje bodisi po odprtju kanala, bodisi – v primeru t. i. inaktivacije iz zaprtja (*closed-state inactivation*) – že iz mirovnega stanja, brez da bi se kanal sploh odprl. Pri različnih vrstah VGIC so bile opisane različne oblike inaktivacije, ki se razlikujejo glede na strukturni mehanizem in kinetiko [1].

N-terminalni del kalijevega kanala naj bi bil odgovoren za hitro inaktivacijo, zato je ta mehanizem poimenovan N-tip inaktivacija. Za razlago tega pojava je bil predlagan model »ball-and-chain«, po katerem N-terminalni »čep« deluje kot gibljiva kroglica, ki se po aktivaciji kanala hitro vstavi v poro s citoplazemske strani in s tem fizično blokira pretok ionov (slika 2a). Podoben mehanizem so zaznali tudi pri evkariontskem Na^+ kanalu. Če se N-terminalni čep odstrani, kanal še vedno lahko preide v inaktivacijo, vendar mnogo počasneje –

ta počasna oblika je poimenovana C-tip inaktivacija. Razširitev selektivnega filtra povzroči izgubo vezavnih mest za K^+ ione (slika 2b) [1, 9].



Slika 2: Mehanizma inaktivacije VGIC. (a) N-tip (hitra) inaktivacija: N-terminalna heliksna struktura deluje kot »čep«. (b) C-tip (počasna) inaktivacija: pride do širjenja selektivnega filtra [1].

Hitra inaktivacija Nav kanalov je ključna za omogočanje ponavljajočega se proženja električnih signalov. V povezovalnem delu med domenama III in IV se nahaja motiv Ile–Phe–Met (IFM), ki posreduje to hitro inaktivacijo. IFM motiv ne blokira neposredno znotrajceličnih vrat, temveč se zagodi v votlino, ki jo tvorijo segmenti S5, S6 in S4–S5 v domenah III in IV. Ta »door wedge« model pojasnjuje, kako vstavitev IFM motiva destabilizira povezavo med poro in S4–S5 obročem, kar vodi do kontrakcije S6 heliksov in posledičnega zaprtja kanala [1, 3].

Vdor Ca^{2+} v celico se ustavi preko inaktivacije kalcijevih kanalov, ki poteka po dveh ločenih poteh: napetostno odvisna inaktivacija (VDI) in od kalcija odvisna inaktivacija (CDI). Pri L-tip kanalih prevladuje CDI, medtem ko so P/Q-tip kanali inaktivirani predvsem preko VDI. Študije so pokazale, da je pri CDI ključnega pomena vezava kalmodulina na C-terminalni motiv Cav. Po drugi strani pa naj bi bila pri VDI vključena $\alpha 1$ -interakcijska domena in z njo povezane β -pomožne podenote [1].

Inaktivacija iz zaprtja (*closed-state inactivation*) je bila opažena pri Nav, Cav in Kv kanalih, najbolj podrobno pa je bila raziskana pri kalcijevem kanalu. Iz segmenta S6 v domeni II pri Cav kanalih izhajata dve kratki citoplazemski vijačnici, poimenovani CH1II in CH2II. Na začetku vijačnice CH2II se nahaja ohranjen triptofan, ki deluje kot organizacijsko središče, saj stabilizira hidrofoben zapiralni del na znotrajcelični strani pore. Poleg tega je bilo opaženo, da VSDII ostaja v deaktiviranem konformacijskem stanju, medtem ko so ostale tri VSD domene v aktiviranem stanju, kar kaže na asimetrično aktivacijo [1, 10].

Čeprav mehanizem delovanja pri večini VGIC še ni popolnoma razjasnjen, obstoječe kristalografske in krio-EM strukture že jasno opredeljujejo ključne elemente tega procesa in omogočajo natančnejše razumevanje ionske prevodnosti, selektivnosti in funkcionalne dinamike kanalov.

3. Fiziološka vloga napetostno-odvisnih ionskih kanalov

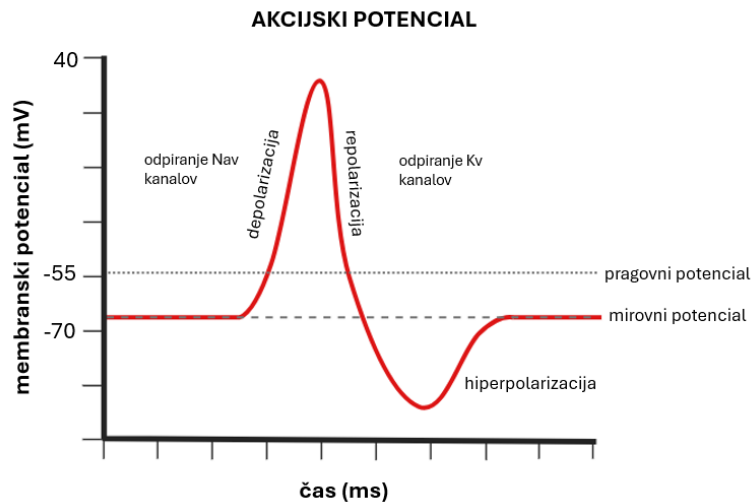
Napetostno-odvisni ionski kanali so ključni pri hitri in natančni komunikaciji vzdražnih celic, kot so nevroni in mišične celice. Regulirajo prehajanje ionov kot odgovor na spremembe membranskega potenciala. Med drugim prispevajo k ustvarjanju akcijskega potenciala, pri sprožanju mišic in širjenju nevronskih signalov.

3.1. Akcijski potencial nevronov

Večina celičnih membran ohranja napetostno razliko med zunanostjo in notranostjo celice, imenovano membranski potencial. V mirovanju ta največkrat meri -70 mV, kar nakazuje na negativno nabito notranost v primerjavi z zunanostjo. Potencial uravnava selektivna prepustnost membrane, predvsem kalijeve (K^+) ionski kanali in delovanje natrij-kalijeve črpalke (Na^+/K^+ ATPaza). V vzdražnih celicah lahko različni signali povzročajo nihanje napetosti, kar vodi v množično odpiranje VGIC kanalov in nastanek akcijskega potenciala [1-3].

Dražljaj povzroča spremembo napetostne razlike oz. depolarizacijo. Ko ta doseže pragovno vrednost, ki največkrat meri okoli -55 mV, se začnejo odpirati napetostno-odvisni natrijevi kanali (Nav). S tem je omogočen prehod Na^+ ionov v celico, ki ga spodbuja tako električni kot koncentracijski gradient. Depolarizacija membrane se tako še poveča, posledično se odpre še več Nav kanalov (pozitivno povratna zanka delovanja). Napetost se običajno poveča do vrednosti med $+30$ in $+40$ mV. Doseg teh vrednosti je hiter in vodi v hitro inaktivacijo Nav kanalov. Prehod Na^+ je ustavljen, počasi pa se odpirajo napetostno-odvisni kalijeve kanali (K_v). Nastopi faza repolarizacije, kjer K^+ ioni izstopajo iz celice, membranski potencial se znižuje. V primerjavi z Nav kanali je zapiranje kalijevih počasno, vrednost membranskega potenciala se tako zniža pod normalno vrednostjo mirovnega potenciala. Pojavi se faza hiperpolarizacije. Sčasoma se ionski kanali vrnejo do prvotnega stanja, mirovni potencial se ponovno vzpostavi. Celoten proces, ki deluje na vse-ali-nič, v nevronih poteka le nekaj tisočink sekunde [1-3].

Po sprožitvi akcijskega potenciala nastopi t. i. neodzivna/refraktarna doba. V absolutni refraktarni dobi ne more priti do ponovne generacije akcijskega potenciala, ne glede na signal. Sledi relativna refraktarna doba, v kateri je za sprožitev novega potenciala potreben dražljaj večje jakosti. Neodzivna doba je posledica inaktiviranosti natrijevih kanalov. Ti delujejo po gating mehanizmu, med procesom se pretvarjajo med tremi stanji. Ko je membranski potencial nizek, je kanal večino časa v deaktiviranem stanju – je zaprt in neprepusten za ione. Po dosegu pragovnega potenciala se pretvori v aktivirano stanje, kjer je odprt in dopušča prehod Na^+ ionov čez celično membrano. Nato pa kanal preide v inaktivirano stanje, v katerem je tehnično “odprt”, vendar napetostna vrednost ne dovoljuje prehoda ionov. V inaktiviranem stanju ostane dokler membranski potencial ne ponovno pade, nato preide v deaktivirano stanje. Verjetnost, da bo kanal prešel neposredno iz inaktiviranega v aktivirano stanje, je nizka [1-3].



Slika 3: Grafični prikaz nastanka akcijskega potenciala.

3.2. Širjenje akcijskega potenciala (prevajanje živčnega impulza)

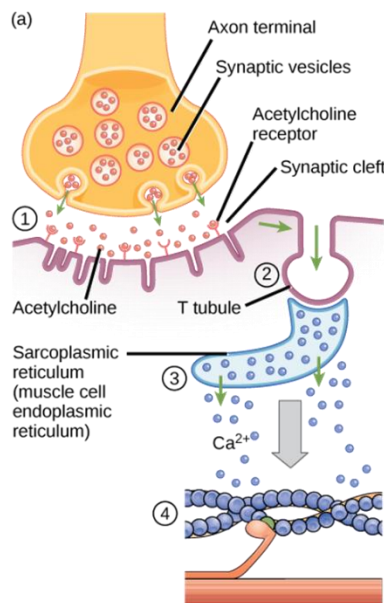
Ko se v nevronu sproži akcijski potencial, se mora ta signal prenesti vzdolž aksona do živčnega končiča, kjer lahko vpliva na druge celice (nevrone, mišične celice, žleze). Proces prevajanja živčnega impulza temelji na zaporednem odpiranju in zapiranju napetostno-odvisnih ionskih kanalov vzdolž membrane aksona. Depolarizacija dela celične membrane povzroči odpiranje bližnjih Nav kanalov in depolarizacijo sosednjih delov membrane. Aksoni so lahko mielizirani – mielin je z lipidi bogat membranski ovoj, ki izolira prevoj ionov. Mielinska ovojnica ni neprekinjena, ionski kanali so tako skoncentrirani v Ranvierjevih vozliščih (enakomerno razporejene nemielizirane prekinitve). Akcijski potencial “skače” od vozlišča do vozlišča, kar imenujemo skokovito prevajanje. Tak način prevajanja je v primerjavi z nepretragnem po nemieliziranih aksonih energetsko varčnejši in hitrejši [1-3].

3.3. Mišična kontrakcija

Mišična kontrakcija je zapleten proces, ki vključuje tudi aktivnost VGIC kanalov, predvsem natrijevih in kalcijevih. Ti se odzivajo na spremembe v membranskem potencialu in so ključni pri pretvorbi električnih signalov v mehansko delo.

Proces krčenja mišice se začne s sprožitvijo akcijskega potenciala v motoričnem nevronu, ki se nato prevaja vzdolž aksona do nevromišičnega stika. Sprememba napetosti v končičih nevrona omogoča izločanje acetilholina. Ta difundira preko sinapse in deluje na receptorje na membrani mišičnih vlaken, kar vodi v odprtje lastnih kationskih kanalov in množičen vdor Na^+ ionov v mišične celice. Lokalna depolarizacija membrane povzroči odprtje Nav kanalov in sprožitev akcijskega potenciala mišice. Ta se prevaja tudi po T-tubulih (podaljški celične membrane), na katerih se nahajajo napetostno-odvisni kalcijevi kanali. Ti urejajo prehode na stiku T-tubulov in sarkoplazemskega retikuluma (SR) ter s tem tudi vplivajo na komunikacijo med SR in mitohondriji. Med skeletnim mišicami in srčno mišico (tudi gladkimi) se pojavijo nekatere razlike. V obeh primerih akcijski potencial aktivira Cav kanale v sarkolemi (membrana mišičnih vlaken), in sicer Cav1.1 in Cav1.2, kar spodbuja sproščanje Ca^{2+} iz SR preko rianodinskih receptorjev RyR1 in RyR2. Ta proces je poznan kot sklopitev vzburjenja in kontrakcije. Mehanizmi v ozadju pa se razlikujejo. Pri srčni mišici komunikacije med Cav1.2

in RyR2 temelji na sproščanju Ca^{2+} , ki ga inducira Ca^{2+} , medtem ko pri skeletni mišici Cav1.1 kanali neposredno aktivirajo RyR1 (Ca^{2+} ni potreben, zato je ta pojav znan tudi kot napetostno-odvisno sproščanje kalcija iz SR). Porast znotrajceličnega Ca^{2+} aktivira črpalko SERCA in izmenjevalec NCX, kar pomaga povrniti koncentracije kalcija na izhodiščno vrednost – tu nastopi tudi Ca^{2+} -odvisna inaktivacija obeh RyR in Cav1.2. Majhen delež Ca^{2+} ionov vstopi tudi v mitohondrije, večji pa pripomore k nadaljnjemu poteku kontrakcije mišic [4, 8, 9]



Slika 4: Vloga napetostno-odvisnih ionskih kanalov pri krčenju skeletne mišice. 1 – sprostitvev acetilholina, 2 – nastanek in potovanje akcijskega potenciala, 3 – sprostitvev Ca^{2+} iz sarkoplazemskega retikuluma, 4 – vezava Ca^{2+} na troponin.

3.4. Druge vloge VGCI kanalov

Napetostno-odvisni kanali imajo pomembne vloge tudi pri izločanju različnih hormonov. Primer je inzulin iz β -celic trebušne slinavke. Ko raven glukoze v krvi naraste, ta vstopi v β -celice preko prenašalcev glukoze (pri ljudeh GLUT1 in GLUT3), kjer se presnavlja in poveča tvorbo ATP. Višja koncentracija ATP povzroči zaprtje ATP-odvisnih kalijevih kanalov, kar zmanjša iztok K^+ ionov in vodi v depolarizacijo celične membrane. Posledično se odprejo Cav kanali (predvsem tipa L, Cav1.2 in Cav1.3), v celico vstopi Ca^{2+} . Povečana koncentracija kalcija sproži ekocitozo inzulinskih zrn. V človeških β -celicah so v manjši meri prisotni tudi Nav kanali (Nav1.3, Nav1.7), kjer okrepijo depolarizacijo in prispevajo k tvorbi akcijskega potenciala. Za ponovno vzpostavitev mirovnega membranskega potenciala se aktivirajo napetostno-odvisni kalijevi kanali (npr. Kav2.2), ki omogočijo repolarizacijo membrane. Napetostno-odvisni kalcijevi kanali imajo pomembno vlogo tudi pri zaznavanju zvoka in procesiranju informacij v notranjem ušesu, najdemo jih tudi v fotoreceptorjih [5, 6, 10].

Napetostno-odvisni natrijevi kanali so ključni dejavniki vzdražnosti senzoričnih nevronov. V odraslih senzoričnih nevronih najdemo več podtipov – Nav1.1, Nav1.6, Nav1.7, Nav1.8 in Nav1.9. Imajo funkcionalne vloge pri signaliziranju bolečine, spremembe v izražanju Nav kanalov in njihove posttranslacijske modifikacije prispevajo k senzitivizaciji nevronov v stanju kronične bolečine [7].

4. Patologija napetostno-odvisnih ionskih kanalov

4.1. Kanalopatije

Kanalopatije so bolezni, ki nastanejo zaradi napak v delovanju ionskih kanalov. Vzrok za njihov nastanek so lahko genetski ali drugi faktorji (pridobljene bolezni, droge, toksini...). Prizadenejo lahko živčni, kardiovaskularni, skeletno-mišični, dihalni sistem, prebavila, povzročajo raka [1]...

Najbolje okarakterizirane kanalopatije so tiste, ki prizadenejo skeletne mišice. Motnje se kažejo tako v hipervzdražljivosti mišic (različne oblike miotonije) kot tudi v hipovzdražljivosti (različne oblike periodične paralize). Pri kongenitalni miotoniji prihaja do napadov mišične togosti zaradi zamika relaksacije mišic. To povzročajo mutacije gena *CLCN1*, ki kodira napetostno-odvisni kloridni kanal *ClC-1*. Divji tip *ClC-1* stabilizira mirovni membranski potencial in sodeluje pri repolarizaciji membrane. Posledica mutacij izgube funkcije (ang. loss-of-function mutations) je zmanjšan tok kloridnih ionov v celico, ki je sicer potreben za kompenzacijo depolarizacije, ki jo inducira akumulacija kalijevih ionov. Pride do spontanega proženja akcijskih potencialov in upočasnjene repolarizacije. Najpogostejšo obliko periodične paralize, tj. hipokalemično periodično (HypoPP), največkrat povzročajo mutacije gena *CACNA1S* za kanal *Cav1.1* ali redkeje mutacije gena *SCN4A* za *Nav1.4* [1]. Mišična vlakna so podvržena »paradoksalni« depolarizaciji kot odziv na nizke vrednosti zunajceličnega kalija. V normalnih pogojih bi sicer prišlo do hiperpolarizacije. Do depolarizacije pride zaradi puščanja natrijevih ali kalijevih kanalov, pride do deaktivacije natrijevih kanalov. Onemogočeno proženje aktivacijskih potencialov preprečuje krčenje mišic - prihaja do več ur ali dni trajajočih obdobj paralize skeletnih mišic [2].

Najpogostejša kanalopatija, ki prizadene kardiovaskularni sistem je kongenitalni sindrom dolgega intervala QT sindrom (LQTS). Za LQTS je značilna podaljšana ventrikularna repolarizacija, ki povečuje tveganje za ventrikularne tahiaritmije, omedlevico in nenaden srčni zastoj. Mutacije izgube funkcije različnih genov, ki kodirajo kalijeve napetostno-odvisne kanale (*KCNQ1*, *KCNH2*, *KCNE1*, *KCNE2*, *KCNJ2*, *KCNJ5*), zmanjšajo tok repolarizacije skozi kanale *Kr*, *Ks* in *Kir*. Ne pride do terminacije akcijskega potenciala, kar podaljša QT interval. Pri nekaterih genih za kalcijeve (*CACNA1C*) in natrijeve napetostno-odvisne kanale (*SCN5A*, *SCN4B*) so mutacije pridobitve funkcije. Povzročijo zakasnjeno zapiranje in inaktivacijo kanalov, kar je vzrok za podaljšan tok ionov v celico in depolarizacijo. Nasprotno se mutacije izgube funkcije kalcijevih kanalov (*CACNA1C*, *CACNB2*, *CACNA2D1*) in mutacije pridobitve funkcije kalijevih kanalov (*KCNH2*, *KCNQ1* in *KCNJ2*) odražajo v sindromu kratkega QT intervala [1].

Mutacije treh genov (*SCN1A*, *SCN2A*, *SCN8A*), ki kodirajo alfa-podenoto natrijevih napetostno odvisnih kanalov, so vzrok za najbolj znane nevrološke kanalopatije. Trenutno je znanih okrog 1500 mutacij gena *SCN1A*, ki kodira alfa-podenoto kanala *Nav1.1*. Od tega je okrog 900 mutacij povezanih z redko obliko epilepsije SMEI, ki ji pravimo tudi Dravetov sindrom. Gre za avtosomalno dominantno bolezen, ki je večinoma povezana z de novo mutacijami. Te so pogosto drugačnosmiselne mutacije in vplivajo na premik bralnega okvirja ali prehitro terminacijo translacije ene kopije *SCN1A*. *Nav1.1* kanali so zato nefunkcionalni, le ena kopija divjega tipa pa ne zadostuje za normalno delovanje – govorimo o haploinsuficienci [3]. Odkrili so 5 drugačnosmiselnih mutacij, ki zagotovo povzročajo nefunkcionalnost *Nav1.1*, sicer pa ni nujno, da se vse drugačnosmiselne mutacije odražajo v izgubi funkcije. Med drugim

lahko oslabijo inaktivacijo kanala, kar vodi v povečano prepustnost kanalov za Na^+ ione. Aktivacijski prag vzdražnih nevronov se zmanjša, torej se njihova vzdražljivost poveča. Lahko pa dolgotrajna depolarizacija membrane zmanjša vzdražnost inhibitornih nevronov [4].

4.2. Vpliv toksinov

Napetostno-odvisni kanali so tarče številnih skupin nevrotoksinov, ki jih izločajo živali in rastline. Z njimi paralizirajo plen [5].

4.3. Vpliv toksinov na natrijeve kanale

Znanih je šest mest na natrijevih napetostno-odvisnih kanalih, ki delujejo kot receptorji za nevrotoksine (tabela 1) [5].

Tabela 1: Nevrotoksini, ki se vežejo na različna receptorska mesta na natrijevih napetostno-odvisnih kanalih. Prilagojeno po viru [5].

Vezavno mesto	Nevrotoksini
1	tetrodotoksin (TTX), saksitoksin (STX), μ -konotoksin
2	batrahotoksin, veratridin, grajanotoksin, akonitin
3	α -toksini iz škorpijona, toksini iz morskih vetrnic, atrahotoksini
4	β -toksini iz škorpijona
5	brevetoksini, ciguatoksin
6	δ -konotoksin

Toksini, ki blokirajo poro, se vežejo na mesto 1, kjer nekateri aminokislinski ostanki tvorijo selektivni filter za natrijeve ione. Vezava toksina nad motiv DEKA v selektivnem filtru pa blokira prehajanje natrija. Pri TTX in STX pozitivno nabita gvanidinska skupina interagira z negativno nabitimi ostanki motiva DEKA. Vezavo nevrotoksina v določenih tipih Nav kanalov dodatno stabilizira interakcija π -kation med tirozinom v domeni I in gvanidinsko skupino. V kanalih Nav1.5 , Nav1.8 in Nav1.9 pa se na mestu tirozina nahajajo cistein ali serin, zaradi česar so ti tipi kanalov manj občutljivi na TTX. Nevrotoksini se na na receptorsko mesto 2 vežejo v aktivnem stanju in interagirajo s transmembranskim segmentom IVS6 ter preko alosteričnega mehanizma inhibirajo inaktivacijo kanalov. Natrijevi kanali so tako ves čas aktivirani tudi pri mirovnem membranskem potencialu. Napetostno odvisna aktivacija se premakne k bolj negativnim vrednostim potenciala. Podobno delujejo nevrotoksini, ki se vežejo na mesto 5. Receptorsko mesto 3 in 6 se nahajata blizu drug drugega, zato nevrotoksini delujejo po podobnem mehanizmu. Oba tipa nevrotoksinov podobno zakleneta konformacijo napetostnega senzorja, tj. segmenta IVS4, in upočasni inaktivacijo kanala. Nevrotoksini, ki se vežejo na receptorsko mesto 4 inducirajo premik napetostno-odvisne aktivacije natrijevih kanalov v smer hiperpolarizacije in zmanjšajo maksimalno amplitudo toka natrijevih ionov. Za visoko afiniteto interakcije med toksinom in receptorskim mestom se mora le-ta nahajati v aktiviranem konformacijskem stanju, kar je možno le po močnem depolarizacijskem pulzu. Med depolarizacijo se namreč zunajcelični del segmenta IIS4 obrne navzven, aminokislinski ostanki zanke S3-S4 pa postanejo dostopni za vezavo. Nevrotoksin tako stabilizira aktivno konformacijsko stanje segmenta IIS4 [5]. Receptorska mesta za nevrotoksine lahko služijo kot tarča za številne učinkovine. V uporabi so lokalni anestetiki (lidokain, benzokain), anti-aritmitiki (flekainid) in anti-epileptiki (fenitoin, karbamazepin...). Ta zdravila se vežejo na poro, tj. receptorsko mesto 1, in preprečujejo tok natrijevih ionov. Nekaj eksperimentalnih zdravil za zdravljenje nevropatske bolečine, ki ciljajo kanal Nav1.7 , je že razvitih, a še niso

bila potrjena s strani FDA. V razvoju so tudi učinkovine, katerih tarče bi bila druga receptorska mesta [6].

4.4. Vpliv toksinov na kalcijeve kanale

Kalcijevi kanali so tarča številnih peptidnih toksinov iz škorpionov, kač, pajkov, morskih polžev... Najbolje okarakterizirani so ω -konotoksini iz morskih polžev rodu *Conus*. So tudi edini znani blokatorji kalcijevih kanalov tipa N [7]. Vežejo se v žep, ki gleda na zunajcelično stran, ter tako fizično blokirajo poro in preprečijo tok kalcija v celico. Različni tipi ω -konotoksinov se razlikujejo v selektivnosti in afiniteti. Večina blokira kalcijeve kanale Cav2.1 in Cav2.2. Pri večini je vezava zelo močna, disociacija pa počasna [18]. Najbolj selektiven je ω -konotoksin GVIA. Nekoliko manj selektiven je MVIIA, ki tudi hitreje disociira z receptorja, zato so na podlagi le-tega sintetizirali zdravilo za lajšanje bolečin zikonotid oz. Prialt. Velik potencial kot zdravilna učinkovina ima tudi CVID, ki je še manj selektiven [19]. Obstaja tudi nekaj ω -konotoksinov, ki blokirajo kalcijeve kanale tipa L, kot je na primer TxVII. ω -agatoksini so iz strupa ameriškega lijakastega pajka *Agenelopsis aperta*. Med njimi je bil v raziskavah kalcijevih kanalov tipa P/Q največkrat uporabljen ω -agatoksin IVA. Veže se na mesto na zunajcelični strani kanalov. Kalcijevih kanalov tako fizično ne blokira, temveč inhibira odpiranje kanala in vstop kalcija. Podobno deluje tudi ω -gramotoksin SIA iz strupa tarantele *Grammostola spatulata* [8]. Večina toksinov iz kač (npr. kalciseptin in kalcikludin) je modulatorjev kalcijevih kanalov tipa L. Kalciseptin iz strupa črne mambe v srčni mišici in gladko-mišičnih celicah blokira kalcijev kanal, v skeletno-mišičnih celicah pa deluje kot agonist in poveča tok kalcija. Glavna tarča kalcikludina iz strupa zelene mambe pa so cerebelarne granularne celice in miociti, kjer pride le do delne inhibicije kanalov [9].

4.5. Vpliv toksinov na kalijeve kanale

Peptidi modificirajo kalijeve kanale preko dveh mehanizmov, podobno kot toksini, ki se vežejo na kalcijeve napetostno-odvisne kanale. Toksini iz škorpionov, morskih vetrnic, morskih polžev in kač se preko lizinskega ostanka vežejo v žep in fizično blokirajo poro. Stabilizirajo se preko interakcije z okoliškimi aminokislinami. Toksini iz pajkov pa vplivajo na napetostno-senzorsko domeno. Večina takih toksinov stabilizira zaprto stanje, torej se kanal težje odpira. Za stabilizacijo vezave toksina se nekaj hidrofobnih aminokislinskih ostankov nespecifično zasidra v membrano. Zaradi te nespecifičnosti, je zdravila težje zasnovati. Obstajajo tudi toksini, ki destabilizirajo odprto stanje kalijevega kanala. Posledica je neprevodno neaktivno stanje pri potencialih, kjer sicer prevladuje aktivnost kanala. Primer takega toksina je hanatoksin, ki inhibira kanale tipa Kv2.1 [20].

5. Evolucija napetostno-odvisnih ionskih kanalov

Napetostno-odvisni ionski kanali so ena izmed najstarejših in najbolj razširjenih družin membranskih proteinov, prisotnih v vseh treh domenah življenja: Bakterije, Arheje in Evkarionti [1]. Čeprav jih pogosto povezujemo z mišičnimi in živčnimi tkivi, so se razvili že mnogo pred pojavom prvega živčnega sistema, oz. pred pojavom večceličnih organizmov nasploh [1]. Homologe domene napetostno-odvisnih kalcijevih, natrijevih in kalijevih kanalov lahko najdemo v genomu enoceličnega evkarionta *Monosiga brevicollis*, ki spada med bičkarje ovratničarje, najbližje enocelične sorodnike živali [1]. To dokazuje, da so se osnovni gradniki električne ekscitabilnosti pojavili že pred razvejitvijo živalske in glivne linije,

delovanje teh kanalov pa je bilo najverjetneje povezano z uravnavanjem intracelularnega kalcija v cilijah in bičkah [1]. Tekom evolucije so napetostno-odvisni kanali začeli sodelovati pri primitivni celični komunikaciji in uravnavanju kontraktilnosti, kar lahko opazimo že v spužvah in plakozojih [2]. Ožigalkarji so prvi razvili izoforme kalcijevih kanalov, specializirane za neuropeptidno izločanje in nevromuskularno povezavo [1], neodvisno pa so rebrače razvile natrijeve kanale s selektivnimi filtri [1].

Eden ključnih dogodkov v evoluciji teh kanalov je bilo dvoje zaporednih podvojenj enodomenskih proteinov, ki so ustvarila štiri-domenske natrijeve kanale z ločenimi skupinami domen (I + III in II + IV) [2]. To je omogočilo postopni razvoj selektivnosti za natrijeve ione iz prvotno kalcijevih kanalov [2]. Nato so zgodnji vretenčarji doživeli dve celogenomski podvojitvi, ki sta iz štirih izoform privedli do osmih, in nato desetih izoform natrijevih kanalov [3]. To je podprlo kompleksnost centralnega in perifernih živčnih sistemov [3]. Vretenčarji so ohranili več napetostno-odvisnih natrijevih, kalijevih in kalcijevih kanalov, ki se med seboj razlikujejo v hitrosti aktivacije, inaktivacije ter interakcijah z regulacijskimi podenotami, kar je povezano z razvojem specializiranih živčnih in mišičnih funkcij [4].

5.1. Evolucija napetostno odvisnih kalijevih kanalov

Med vsemi napetostno odvisnimi ionskimi kanali so se kalijeve evolucijsko pojavili prvi. Njihovi najverjetnejši predhodniki so bili enodomenski 6TM-kanali, sestavljeni iz pornega dela, selektivnega za kalijeve ione, in napetostno občutljivega dela, ki vključuje helikse S1–S4 [1]. Prototipne oblike teh kanalov zasledimo že pri prokariontih, na primer pri arhejskem napetostno-odvisnem kalijevem kanalu iz *Aeropyrum pernix* in bakterijskem kalijevem kanalu iz *Listeria monocytogenes* [1][2]. Sorodni 6TM-kanali s funkcionalnim napetostnim senzorjem (zlasti heliks S4, bogat s pozitivno nabitimi aminokislinami) so prisotni tudi pri enoceličnih evkariontih, kot je koanoflagelat *Monosiga brevicollis*, ter pri večceličnih živalih, kot so plakozoe in rebrače [1] [3]. Evolucija napetostno odvisnih kanalov v linijah metazojev je najverjetneje vključevala postopno združevanje ločenih proteinskih domen in pa zaporedne duplikacije genov za enodomenske predhodnike [3]. Tako najdemo pri najzgodnejših živalih širok nabor teh kanalov – morska anemona (*Nematostella vectensis*) ima okoli 44 genov za Kv, hidra približno 35, medtem ko so spužve (Porifera) večino teh genov izgubile in ohranile le gene za napetostno-neodvisne kalijeve kanale. Vretenčarji, vključno s človekom, imajo približno 40 različnih genov za napetostno odvisne kalijeve kanale [4]. Pri sesalcih eno izmed skupin genov, ki izvirajo iz enega predniškega gena in kodirajo za Kv imenujemo družina Shaker. Vključuje osem genov, medtem ko imajo nekateri nevretenčarji, npr. morska vetrnica kar 20 različnih, od katerih je večina funkcionalnih [5].

5.2. Evolucija napetostno-odvisnih kalcijevih kanalov

Kalcijevi napetostno-odvisni kanali (Cav) predstavljajo staro, a redko prisotno družino ionskih kanalov, ki se pojavljajo pri številnih evkariontskih skupinah [1]. V protistih so prisotni v nekaterih linijah, kot so ciliati (*Paramecium*), kjer sodelujejo pri gibanju, ter v algah (*Chlamydomonas*), diatomejah in dinoflagelatih, kjer imajo vlogo v stresnih odzivih, infekciji in bioluminiscenci [2] [3]. Kljub temu jih mnoge protistične in glivne linije nimajo, saj v teh organizmih prevladujejo alternativni mehanizmi za vnos kalcija, kot so ligandsko-odvisni ali TRP kanali. Pri glivah na primer vnos Ca^{2+} poteka preko kanalov, sorodnim metazoanskemu Na^+/Li^+ napetostno-odvisnemu kanalu [1]. Prisotnost Cav kanalov v zelenih algah kaže, da so

bili prisotni že v skupnem predniku rastlin in živali [4]. Pri živalih se Cav kanali aktivirajo ob depolarizaciji membrane in sprožajo vstop Ca^{2+} , ki uravnava pomembne celične funkcije, kot so sproščanje nevrottransmiterjev, transkripcija genov in aktivacija kalcijsko-odvisnih encimov [5]. Ločimo jih na kanale z nizkim pragom aktivacije (T-tip ali Cav3) in visokopražne (Cav1 in Cav2). Pri bičkarjih ovratničarjih, najbližjih sorodnikih živali, sta prisotna predstavnika obeh tipov, medtem ko T-tipa kanalov ni v nekaterih zgodnjih živalskih linijah, kot so spužve in rebrače, kar kaže na večkratne izgube [1]. Pri ožigalkarjih in vretenčarjih so se Cav geni neodvisno večkrat podvojili. Ožigalkarji, kot so morske vetrnice in korale, imajo šest Cav genov, ki so evolucijsko stabilni že več kot 500 milijonov let, kar nakazuje njihovo funkcionalno specializacijo. Vretenčarji imajo zaradi dveh celogenomskih podvojitev deset Cav kanalov, kar omogoča večjo funkcionalno raznolikost [1] [5]. Elektrofiziološke raziskave kanalov pri meduzah in morskih vetrnicah so razkrile posebne ionske preference, kot je večja prepustnost za Sr^{2+} kot za Ca^{2+} ali preferenca Ca^{2+} pred Ba^{2+} , kar kaže na pomembne spremembe v strukturi teh kanalov med evolucijo živali [6].

5.3. Evolucija napetostno-odvisnih natrijevih kanalov

Nav kanali so odgovorni za začetek in širjenje električnega signala v živčnih celicah, pri čemer omogočajo hitre napetostno odvisne spremembe v membranskem potencialu. Tipična lastnost teh kanalov je hitra inaktivacija, ki je povezana z gibanjem napetostnega senzorja v četrti domeni (DIV), kar pripelje do blokade kanala z inaktivacijskim delom na notranji strani [1]. Pri večini živali in gliv je selektivni filter za natrijeve ione sestavljen iz štirih aminokislin (Asp-Glu-Lys-Ala), pri čemer je Lizin v DIII ključen za selektivnost natrija [2]. Homologi Nav kanalov so prisotni v enoceličnih evkariontih, kot sta *Thecamonas trahens* in *Monosiga brevicollis*, kar kaže, da so Nav kanali nastali pred razvojem živčnega sistema, več kot milijardo let nazaj. Pri nekaterih organizmih, kot so *Trichoplax* in *Mnemiopsis*, so Nav kanali prisotni, vendar brez homologov v porah spužv. V genomu morskih vetrnic (*Nematostella*) najdemo gene za še nerazvite in nespecifične Nav2 kanale in za prehodno obliko kanalov, Nav2.5, ki so bolj specifični za natrijeve ione, medtem ko v drugih organizmih, kot je *Drosophila melanogaster*, obstajajo samo Nav1 in Nav2 geni, ki ustvarjajo številne izoforme [1]. Pri metazoanih, predvsem vretenčarjih, je Nav1 kanal nastal zaradi dveh podvojitev v zgodnjem razvoju teh organizmov. Nav1 kanali so specifični za bilaterale, medtem ko so Nav2 kanali bolj prisotni pri ožigalkarjih, kot so morski anemoni, ki imajo kanale z unikatnim selektivnim filtrom. Nav2 kanali, ki omogočajo prevodnost natrija in kalcija, so se pojavili pred ločitvijo gliv in živali in so bili prisotni v rodu *Thecamonas*, prisotnost Nav2.5 pa je danes specifična le za ožigalkarje (npr. *Nematostella*). Nav1 kanali so tekom razvoja postali ključni za živčni prenos v kompleksnejših živčnih sistemih [3]. V bakterijah obstaja družina NaChBac, ki vsebuje kanale z selektivnim filtrom, ki spominja na tiste v Cav kanalih [4]. Na splošno so Nav kanali tekom evolucije nastali neodvisno v treh različnih linijah: v bakterijah, cnidarianih (Nav2.5) in bilateralih (Nav1). To kaže na pomembnost Nav1 kanalov za ločevanje signalizacije kalcija in natrija, kar omogoča razvoj živčnega sistema in naprednejših funkcij v metazoah [3]. Zanimivo je, da so pri preprostih živčnih sistemih, npr. pri črvih, nekatere vrste ohranile Nav2 kanale z večjo preferenco za kalcij, kar kaže, da so kalcijevi akcijski potenciali lahko še vedno koristni v preprostih nevronih, kljub evolucijskim prednostim natrija [1].

6. Literatura

Uvod

- [1] Huang, J., Pan, X. & Yan, N. Structural biology and molecular pharmacology of voltage-gated ion channels. *Nat Rev Mol Cell Biol* 25, 904 – 925 (2024).
- [2] Rathour, R. K. & Kaphzan, H. Voltage-Gated Ion Channels and the Variability in Information Transfer. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 16, (2022).
- [3] Catterall, W. A. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annual Review of Biochemistry*, 64, 493 – 531 (1995).
- [4] Bezanilla, F. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiological Reviews*, 80(2), 555 –592 (2000).
- [5] Ranjan, R., Logette, E., Marani, M., Herzog, M., Tâche, V., Scantamburlo, E., Buchillier, V., & Markram, H. A kinetic map of the homomeric voltage-gated potassium channel (Kv) family. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, Article 358 (2019).
- [6] Doyle, D. A., Cabral, J. M., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., & MacKinnon, R. The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, 280 (5360), 69 – 77 (1998).
- [7] Catterall, W. A. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3 (8) (2011).
- [8] Stauber, T., & Jentsch, T. J. Cell biology and physiology of CLC chloride channels and transporters. *Comprehensive Physiology*, 3 (1), 171 – 206 (2012).

Struktura napetostno-odvisnih ionskih kanalov

- [1] J. Huang, X. Pan, N. Yan: Structural biology and molecular pharmacology of voltage-gated ion channels. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2024 25:11 2024, 25, 904–925.
- [2] D. A. Doyle, J. M. Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait, R. MacKinnon: The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* (1979) 1998, 280, 69–77.
- [3] J. Payandeh, T. Scheuer, N. Zheng, W. A. Catterall: The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* 2011, 475, 353–359.
- [4] J. Wu, Z. Yan, Z. Li, C. Yan, S. Lu, M. Dong, N. Yan: Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 complex. *Science* (1979) 2015, 350.
- [5] H. Shen, Q. Zhou, X. Pan, Z. Li, J. Wu, N. Yan: Structure of a eukaryotic voltage-gated sodium channel at near-atomic resolution. *Science* (1979) 2017, 355.
- [6] S. Y. Noskov, S. Bernéche, B. Roux: Control of ion selectivity in potassium channels by electrostatic and dynamic properties of carbonyl ligands. *Nature* 2004, 431, 830–834.

- [7] G. Alberini, S. Alexis Paz, B. Corradi, C. F. Abrams, F. Benfenati, L. Maragliano: Molecular Dynamics Simulations of Ion Permeation in Human Voltage-Gated Sodium Channels. *J Chem Theory Comput* 2023, 19, 2953–2972.
- [8] C. A. Ahern, J. Payandeh, F. Bosmans, B. Chanda: The hitchhiker's guide to the voltage-gated sodium channel galaxy. *Journal of General Physiology* 2016, 147, 1–24.
- [9] C. Fan, N. Sukomon, E. Flood, J. Rheinberger, T. W. Allen, C. M. Nimigean: Ball-and-chain inactivation in a calcium-gated potassium channel. *Nature* 2020 580:7802 2020, 580, 288–293.
- [10] Y. Dong, Y. Gao, S. Xu, Y. Wang, Z. Yu, Y. Li, B. Li, T. Yuan, B. Yang, X. C. Zhang, et al.: Closed-state inactivation and pore-blocker modulation mechanisms of human CaV2.2. *Cell Rep* 2021, 37.

Fiziološka vloga napetostno-odvisnih ionskih kanalov

- [1] *Action potential* - Wikipedia. (b. d.). [citirano: 9. 5. 2025] https://en.wikipedia.org/wiki/Action_potential
- [2] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Ion Channels and the Electrical Properties of Membranes*.
- [3] Grider, M. H., Jessu, R., & Kabir, R. (2023). Physiology, Action Potential.
- [4] Gash, M. C., Kandle, P. F., Murray, I. v., & Varacallo, M. A. (2023). Physiology, Muscle Contraction. *StatPearls*.
- [5] Braun, M., Ramracheya, R., Bengtsson, M., Zhang, Q., Karanauskaite, J., Partridge, C., Johnson, P. R., & Rorsman, P. (2008). Voltage-Gated Ion Channels in Human Pancreatic β -Cells: Electrophysiological Characterization and Role in Insulin Secretion. *Diabetes*, 57(6), 1618–1628.
- [6] Thompson, B., & Satin, L. S. (2021). Beta-cell Ion Channels and Their Role in Regulating Insulin Secretion. *Comprehensive Physiology*, 11(4), 1.
- [7] Bennett, D. L., Clark, X. A. J., Huang, J., Waxman, S. G., & Dib-Hajj, S. D. (2019). The role of voltage-gated sodium channels in pain signaling. *Physiological Reviews*, 99(2), 1079–1151.
- [8] Catterall, W. A. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3 (8) (2011).
- [9] Avila, G., de la Rosa, J. A., Monsalvo-Villegas, A., & Montiel-Jaen, M. G. (2019). Ca²⁺ Channels Mediate Bidirectional Signaling between Sarcolemma and Sarcoplasmic Reticulum in Muscle Cells. *Cells* 2020, Vol. 9, Page 55, 9(1), 55.
- [10] Gil-Rivera, M., Medina-Gali, R. M., Martínez-Pinna, J., & Soriano, S. (2021). Physiology of pancreatic β -cells: Ion channels and molecular mechanisms implicated in stimulus-secretion coupling. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 359, 287–323.

Patologija napetostno-odvisnih ionskih kanalov

- [1] J.-B. Kim: Channelopathies. *Korean J Pediatr* 2014, 57, 1.
- [2] G. W. Zamponi, J. Striessnig, A. Koschak, A. C. Dolphin: The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacol Rev* 2015, 67, 821–870.
- [3] R. Barbieri, M. Nizzari, I. Zanardi, M. Pusch, P. Gavazzo: Voltage-Gated Sodium Channel Dysfunctions in Neurological Disorders. *Life* 2023, 13, 1191.
- [4] T. H. Rhodes, C. Lossin, C. G. Vanoye, D. W. Wang, A. L. George: Noninactivating voltage-gated sodium channels in severe myoclonic epilepsy of infancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2004, 101, 11147–11152.
- [5] W. A. Catterall, S. Cestèle, V. Yarov-Yarovoy, F. H. Yu, K. Konoki, T. Scheuer: Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon* 2007, 49, 124–141.
- [6] G. Wisedchaisri, T. M. Gamal El-Din: Druggability of Voltage-Gated Sodium Channels—Exploring Old and New Drug Receptor Sites. *Front Pharmacol* 2022, 13.
- [7] J. Striessnig, H. Glossmann: Calcium Channel Toxins. In *Selective Neurotoxicity*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1994; pp 775–805.
- [8] E. Bourinet, G. W. Zamponi: Block of voltage-gated calcium channels by peptide toxins. *Neuropharmacology* 2017, 127, 109–115.
- [9] E. Pringos, M. Vignes, J. Martinez, V. Rolland: Peptide Neurotoxins That Affect Voltage-Gated Calcium Channels: A Close-Up on ω -Agatoxins. *Toxins (Basel)* 2011, 3, 17–42.
- [10] Y. Zhao, J. Huang, X. Yuan, B. Peng, W. Liu, S. Han, X. He: Toxins Targeting the KV1.3 Channel: Potential Immunomodulators for Autoimmune Diseases. *Toxins (Basel)* 2015, 7, 1749–1764.

Evolucija napetostno-odvisnih ionskih kanalov

- [1] Liebeskind, B. J., Hillis, D. M., & Zakon, H. H. (2015). Evolution of voltage-gated ion channels at the emergence of Metazoa. *Journal of Experimental Biology*, 218(4), 515–525. <https://doi.org/10.1242/jeb.110254>
- [2] Barzilai, M. G., Reitzel, A. M., Kraus, J. E., Gordon, D., Technau, U., Gurevitz, M., & Moran, Y. (2012). Convergent evolution of sodium ion selectivity in metazoan neuronal signaling. *Cell Reports*, 2(2), 242–248. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.06.016>
- [3] Zakon, H. H., & Jost, M. C. (2021). Evolution of sodium channels and the role of gene duplication. In *Encyclopedia of Neuroscience* (2nd ed.). Elsevier.
- [4] Abbott, G. W. (2020). KCNQs: Ligand- and Voltage-Gated Potassium Channels. *Frontiers in Physiology*, 11, 583. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00583>
- [5] R. Li et al. (2023). Functional diversity of Shaker K⁺ channels and their evolutionary expansion in cnidarians. *Neuron*, 111(20), 3401–3416.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.07.013>

[6] Li, R. et al. (2023). Functional diversity of voltage-gated calcium channels in cnidarians. *Neuron*, 111(20), 3401–3416.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.07.013>