

УДК 577

КІЛЬКІСНИЙ АНАЛІЗ АКТИВАЦІЇ ІОННОГО КАНАЛУ TRPC4

Кім О.С.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна
e-mail: kimolenas@gmail.com

Надійшла до редакції 12.06.2014

Канали транзйентного рецепторного потенціалу (Transient Receptor Potential, TRP) формують несективні Ca^{2+} -проникні катйонні канали. Дослідження було проведено на йонному каналі TRPC4, який є рецептор-керованим йонним каналом. Моделі, які б чітко описували переходи між мкростанами каналу, ще потребують удосконалення. Метою роботи було клькйсно дослідити активацію каналу TRPC4. Виявлено, що йснує щонайменше 3 вйкритих та 4 закритих мкростанів. Зв'язки між цими кйнетичними станами дослідженні методом максимальної правдоподйбності та виявлено 3 пари реверсивних зв'язків. Використовуючи програму QuB були розраховані константи швидкості для кожного переходу. Отримана модель може пояснити цикльну активність каналу TRPC4.

Ключові слова: йонні канали, кальцій, TRPC4, кйнетична модель.

ВСТУП

Канали транзйентного рецепторного потенціалу (Transient Receptor Potential, TRP) формують велику супер-родину несективних Ca^{2+} -проникних катйонних каналів, до якої у ссавців входять 28 видів йонних каналів, які розділені на шість підродин. Вони присутні в усіх тканинах організму (мозок, гладенькі м'язи тощо), зокрема TRPC4 (Transient Receptor Potential classical 4) експресуються в ендотелії і гладеньких м'язах шлунково-кишкового тракту) [1]. Робота цього каналу дуже важлива при холінергічній сигналізації та активації скорочення вйсцеральних гладеньких м'язів [2]. Структурно, канали TRPC4, мають аналогйчну всім TRP каналам топологію: шість трансмембранних доменів (S1-S6), внутрйшньокльтинні N-і C-кйнці, і пороутворюючі домени — S5 і S6, а також P-петлю між ними. На N-кйнці знаходяться послйдовності аналогйчні бйлку анкірину [1]. Є суттєві докази важливої ролі TRPC4 у йндукції проліферації гладеньких м'язів судин та ендотелйальних клйтин, і фенотипової змйни гладеньких м'язів — вйд скорочувального до синтетичного. Тому цей канал є перспективним об'єктом дйї фармакологйчних препаратів для регуляції проліферативних судинних розладів: патологйй пов'язаних з атеросклерозом, пошкодження судин при легеневої артерйальній гйпертензії [3,4]. Метою роботи є дослідження кйнетики переходів між станами рецептор-керованого йонного каналу TRPC4.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дорослі самці морських свинок вагою 300-400 г, були вбиті дислокацією шийних позвонків з подальшим негайним знекровлення вйповідно до "The European Directive on the protection of animals used for scientific purposes" (2010/63/EU). Гладеньком'язові клйтини з поздовжнього м'язового шару клубової кишки дорослого самця морської свинки йзолювали за допомогою стандартного ферментативно-механйчного методу (Zholos, Bolton, 1997). Мускариновий катйонний струм був активований при додаванні 50 μM карбахолу до зовнйшньокльтинного розчину або 200 μM GTP γS до розчину в пйпетці з метою прямої активації G-бйлків, омйнаючи мускаринові рецептори. Зовнйшній розчин був приготований з концентрацією Cs^+ 124 мМ, щоб блокувати струми через калйєві канали. Пйпетки були заповнені цезйєвим розчином (124 мМ) ($[\text{Ca}^{2+}]$ пйтримувався на рйвнй 100 нМ з використанням ВАРТА). Колагеназа (типу 1А), магнйєва сйль АТФ, лйгйєва сйль GTP, GTP γS тетралйгйєва сйль, NEPES, ВАРТА, NMDG і карбахол були отримані вйд Sigma-Aldrich. Всі йнші хймічні речовини були з BDH Laboratory Supplies (AnalaR grade). Дані були проаналйзовані з використанням Clampfit (Molecular Devices, США) і QuB (University of Buffalo, США). Для детекції подйй (вйдкриття або закриття каналу) використовували критерйй перетину критичного порогу (50% амплйтуди окремих подйй). Гйстограми вйкритих і закритих станів будувалися зазвичай, як розподіл логарифма тривалості подйй (в мс) (20 бйнів на декаду), з експоненціальними компонентами, встановлених за методом максимальної ймовйрності (Colquhoun і Hawkes, 1995). Клькйсть компонентів визначали за

допомогою програмного забезпечення Clampfit при довірчому рівні 0,95.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження імовірності відкритого стану каналу. Для подальшого аналізу цей етап дуже важливий, оскільки, це дає змогу визначити кількість каналів у фрагменті мембрани та відсутність десенситизації каналу. Приклад реєстрації, які були використані для аналізу, зображена на рис. 1. Були побудовані графіки залежності величини P_0 , яка була отримана в інтервалі 60 секунд, від часу (рис. 1) для каналів TRPC4 при додаванні розчину карбохолу. Реєстрація тривала декілька хвилин, оскільки аналіз поодиноких каналів потребує тривалої реєстрації для накопичення значної кількості подій. З рис.1 видно, що канали не десенситизувалися, що дає змогу використати ці дані для подальшого аналізу. Величина середньої P_0 , яка дорівнює $0,59 \pm 0,10$, та відсутність кратних амплітуд дає змогу зробити

висновок, що в фрагменті мембрани знаходився лише 1 активний канал.

Фітування гістограм тривалості відкритих і закритих станів у програмі ClampFit та аналіз графіків часових розподілів. Для початку були побудовані гістограми розподілу відкритих станів, при чому замість часу був використаний логарифм часу ($\log t$), а також квадратний корінь з кількості подій (\sqrt{N}). Після фітування гістограм тривалості відкритого та закритого станів визначили, що існує щонайменше 3 і 4 експоненційні компоненти, відповідно для відкритих і закритих станів каналу (рис. 2). Константи часу (τ) стану кожної компоненти визначалися за допомогою комп'ютерної програми Clampfit. Аналіз кореляцій тривалості сусідніх станів [5], показав, що довгі відкриття пов'язані з короткими закриттями, і навпаки: довгі закриті інтервали суміжні з короткими відкритими.

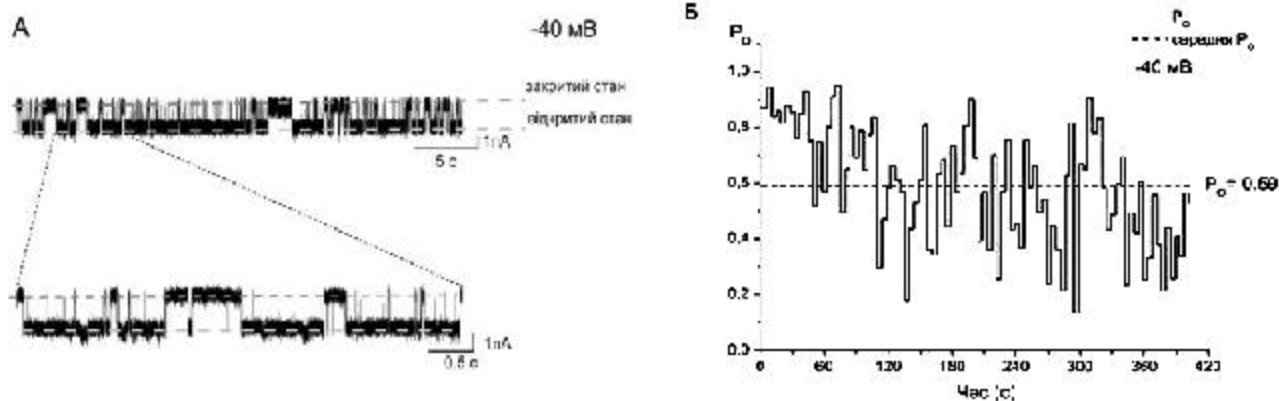


Рис. 1. А — приклад типової реєстрації струму TRPC4 каналу використаної для аналізу. Вверху — реєстрація активності каналу тривалістю 30 с, внизу — її фрагмент тривалістю 5 с, що ілюструє переходи між закритими і відкритими станами каналу. Б — графік залежності імовірності відкритого стану від часу при -40 мВ ($P_0 = 0.59$).

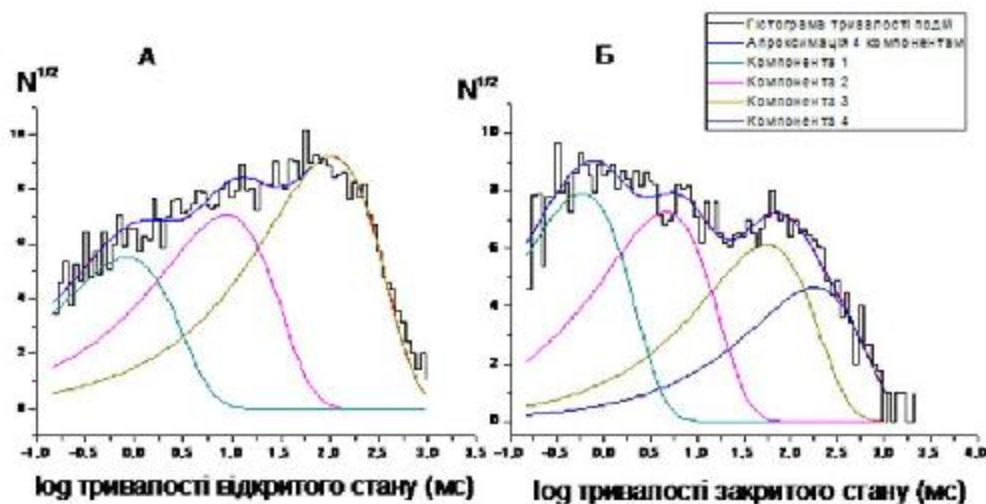


Рис. 2. Фітування гістограм розподілів часу життя каналу для реєстрації при -40 мВ. А - фітування гістограми тривалості відкритого стану сумою експонент з постійними часу ($\tau \pm S.E.$, мс) для кожної компоненти відповідно: 1 – $1,00 \pm 0,13$, 2 – $8,73 \pm 0,08$, 3 – $103,46 \pm 0,04$. Б - фітування гістограми тривалості закритого стану сумою експонент з постійними часу ($\tau \pm S.E.$, мс) для кожної компоненти відповідно: 1 – $0,55 \pm 0,07$, 2 – $4,59 \pm 0,10$, 3 – $60,72 \pm 0,27$; 4 – $195,52 \pm 0,52$.

Побудова кінетичної моделі роботи каналу TRPC4 та отримання констант швидкостей переходів між станами. Згідно отриманих даних була запропонована модель переходів з одного стану в інший. Були проаналізовані різні варіанти моделі, в залежності від наявності переходів між мікростанами. Всі вони оцінювалися за коефіцієнтом максимальної вірогідності (LL) та фітуванням гістограм тривалості макростанів. На рис. 3 зображена модель з найбільшим коефіцієнтом LL (LL= 47890), тобто ця модель є найбільш ймовірною моделлю активації TRPC4. Для цієї моделі були визначена максимальна

вірогідність цих переходів або константи швидкостей. Отримані константи швидкостей показують, що в моделі 7 станів каналу більш імовірними є переходи між сусідніми вертикальними парами станів, тоді як горизонтальні переходи є менш ймовірними, що пояснює природу циклічної активності TRPC4 (рис. 1,Б). Також був відтворений (симульований) струм поодинокого каналу при мембранному потенціалі -40мВ використовуючу дану модель (рис. 4). Симуляція має такий же циклічний характер, що і експериментальні реєстрації.

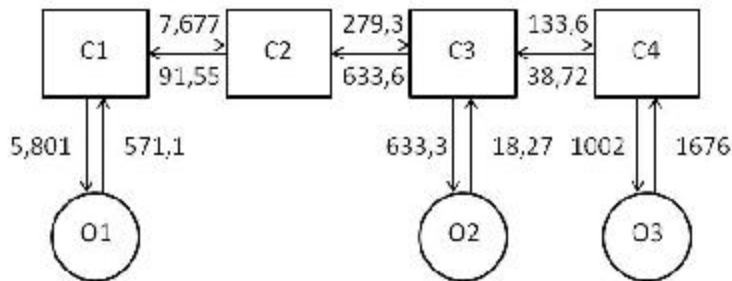


Рис. 3. Модель 7 станів TRPC4 з з відповідними значеннями констант швидкості (в с⁻¹) переходів між кінетиснами станами каналу (квадратами позначенні закриті стани, колами — відкриті). Константи швидкостей переходів між мікростанами були розраховані з використанням програми QuB.

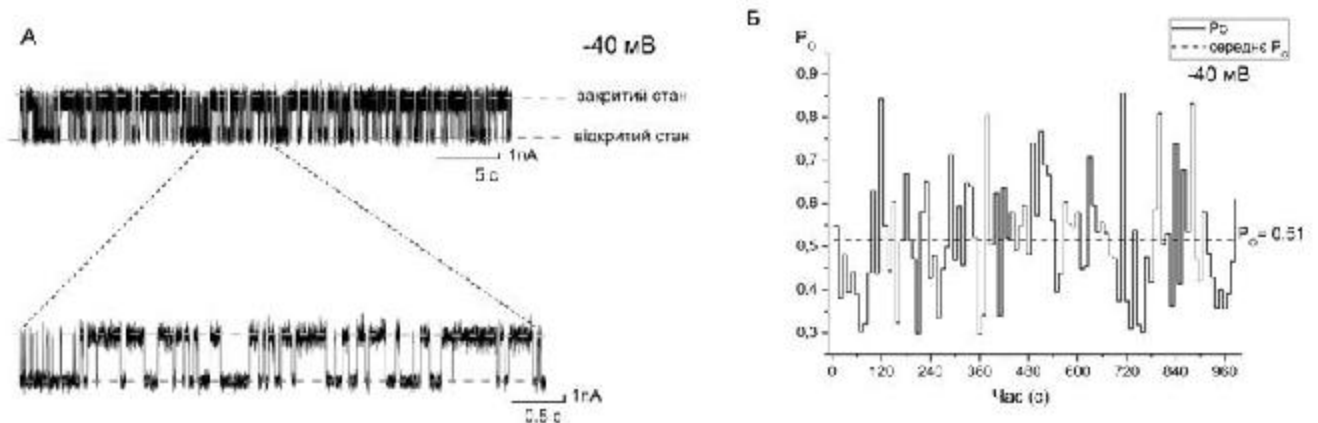


Рис.4. Приклад симуляції струму поодинокого каналу зі стандартним рівнем шуму (фільтр 10 кГц, роздільна здатність 0,1 мс) : А - фрагмент реєстрації при мембранному потенціалі -40мВ тривалістю 30 с та 5 с, Б - графік залежності імовірності відкритого стану від часу для зазначеної реєстрації в 120 с інтервалах.

ВИСНОВКИ

Аналіз 2D розподілів часу життя каналу в закритих і відкритих станах показав наявність принаймні 7 кінетичних станів – 3 відкритих і 4 закритих, а також виявив значні кореляції між окремими станами. З різних варіантів можливих переходів між цими станами методом максимальної правдоподібності було отримана модель активації TRPC4 та розраховані всі константи швидкостей переходів. Таким чином, в роботі розроблено першу повну кінетичну модель активації рецептор-керованого катіонного каналу TRPC4, що дає можливість симулювати його активність при різних потенціалах і пояснює, яким

саме чином відбувається циклічна зміна P_o. Вирішальна роль TRPC4 для функції гладеньких м'язів може бути також актуальною в інших типах клітин, включаючи нейрони, де TRPC4 канали також ймовірно відкриваються при активації метаботропних рецепторів і спричиняють деполаризацію мембрани і вхід кальцію, але застосовність запропонованої моделі TRPC4 для інших типів клітин потребує подальших досліджень.

Висловлюю щирю вдячність за допомогу та наукові поради проф. Жолосу О.В. (Київський національний університет імені Тараса Шевченка).

Література

1. Ramsey I.S. An introduction to TRP channels. / Delling M., Clapham D.E. // *Annu Rev Physiol.* — 2006. — Vol. 68. — P. 619–647.
 2. Tsvilovsky V.V. Deletion of TRPC4 and TRPC6 in mice impairs smooth muscle contraction and intestinal motility in vivo. / Zholos A.V., Aberne T., Philipp S.E., Dietrich A., Zhu M.X., et al. // *Gastroenterology* — 2009. — Vol. 137. — P. 1415–1424.
 3. Plant T.D., Schaefer M. Receptor-operated cation channels formed by TRPC4 and TRPC5 Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. — 2005. — Vol. 371. — P. 266–276.
 4. Zholos A.V., Curtis T.M. TRP Channels in Vascular Disorders. CTMC — 2013. — Vol. 13. — P. 295–309.
 5. Magleby K.L., Song L. Dependency plots suggest the kinetic structure of ion channels. // *Proc. R. Soc. Lond. B.* — 1992. — Vol. 249. — P. 133–142.
 6. Mery L. The PDZ-interacting domain of TRPC4 controls its localization and surface expression in HEK293 cells / Strausse B., Dufour J.F., Krause K.H., Hoth M. // *J. Cell Sci.* — 2002. — Vol. 115. — P. 3497–3508.
 7. Zholos A.V., Bolton T.B. Muscarinic receptor subtypes controlling the cationic current in guinea-pig ileal smooth muscle. // *Br. J. Pharmacol.* — 1997. — Vol. 122. — P. 885–893.
 8. Zholos A.V. G-protein-gated TRP-like cationic channel activated by muscarinic receptors: effect of potential on single-channel gating. / Zholos A.A., Bolton T.B. // *J. Gen. Physiol.* — 2004. — Vol. 123. — P. 581–598.
 9. Wang Y.X. M2 receptor activation of nonselective cation channels in smooth muscle cells: calcium and Gi/G(o) requirements / Fleischmann B.K., Kotlikoff M.I. // *Am J Physiol.* — 1997. — Vol. 273. — P. 500–508.
 10. Zholos A.V. Phospholipase C, but not InsP3 or DAG, -dependent activation of the muscarinic receptor-operated cation current in guinea pig ileal smooth muscle cells. / Tsytysura Y.D., Gordienko D.V. et al. // *Br. J. Pharmacol.* — 2004. — Vol. 141. — P. 23–36.
 11. Walker R.L. Differential expression and alternative splicing of TRP channel genes in smooth muscles. / Hume J.R., Horowitz B. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* — 2001. — Vol. 280. — P. 1184–1192.
- Clapham D.E. The TRP ion channel family / Runnels L.W., Strübing C. // *Nat. Rev. Neurosci.* — 2001. — Vol. 2. — P. 387–396.

QUANTITATIVE ANALYSIS OF TRPC4 ION CHANNEL ACTIVATION

Kim O.S.

Transient receptor potential channels (TRP) are non-selective cation channels, most of which are permeable to Ca^{2+} . The research was conducted on TRPC4 channel, which is the member of the classic subfamily of TRPs. It belongs to the subgroup of receptor-activated ion channels. TRPC4 plays a prominent and well-characterised role in the cholinergic excitation and contraction of gastrointestinal tract. The main aim of our research was to characterize quantitatively TRPC4 channel gating. It was found, that TRPC4 gates in the main 3 open and 4 closed kinetic microstates. The connections between these states have been characterized by the maximum likelihood methods and included 3 pairs of reversible transitions. Furthermore, the rate constants for all individual transitions have been calculated using the QuB software. The model can explain the cyclical behavior of channel activity.

Keywords: ion channels, calcium, TRPC4, kinetic model.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ АКТИВАЦИИ ИОННОГО КАНАЛА TRPC4

Kim O.S.

Каналы транзиентного рецепторного потенциала (TRP) являются неселективными катионными каналами, большинство из которых являются проницаемыми для Ca^{2+} . Исследование было проведено на канале TRPC4 – рецептор-активируемом канале классического подсемейства TRP каналов. Главной целью нашего исследования является количественно охарактеризовать работу канала TRPC4. Выявлено, что существует по меньшей мере 3 открытых и 4 закрытых микросостояний. Связи между этими кинетическими состояниями исследовались методом максимального правдоподобия и было обнаружено 3 пары реверсивных связей. Используя программу QuB были рассчитаны константы скорости для каждого перехода. Полученная модель может объяснить циклическую активность канала TRPC4.

Ключевые слова: ионные каналы, кальций, TRPC4, кинетические модели.