

Wpływ pH na efekt modulacji aktywności kanałów potasowych Kv1.3 przez jony cynku

Andrzej Teisseyre, Jerzy W. Mozrzymas

Akademia Medyczna we Wrocławiu
Katedra i Zakład Biofizyki

Streszczenie

Przy zastosowaniu techniki patch-clamp w konfiguracji whole-cell prowadzono badania nad wpływem zewnątrzkomórkowego pH na efekt modulacyjny wywierany na kanały Kv1.3 przez jony cynku. Stwierdzono, że obniżenie pH z 7.35 do 6.8 spowodowało znaczące przesunięcie napięciowej zależności aktywacji badanych kanałów w stronę dodatnich wartości potencjału błonowego oraz zmniejszenie szybkości ich aktywacji. Stwierdzono też, że obniżenie pH z 7.35 do 6.8 nie miało istotnego wpływu na przesunięcie napięciowej zależności aktywacji kanałów Kv1.3 w stronę dodatnich wartości potencjału błonowego, zmniejszenie amplitudy prądów potasowych oraz spowolnienie ich aktywacji zachodzące podczas aplikacji jonów cynku w stężeniu 100 μ M. Całkowite przesunięcie napięciowej zależności aktywacji, jak również spowolnienie szybkości aktywacji kanałów pod wpływem działania obydwu wyżej wspomnianych czynników było istotnie większe od zmian spowodowanych przez aplikację jonów cynku bez zmiany pH. Generalnie, otrzymane wyniki pokazały, że addytywne efekty modulacyjne wywierane na kanały Kv1.3 przez jony cynku i protony mogą zachodzić przy wartościach zewnątrzkomórkowego pH i przy stężeniach jonów cynku osiągalnych w warunkach fizjologicznych.

Wstęp

Wiadomo, że jony cynku występują w centralnym układzie nerwowym, gdzie odgrywają między innymi rolę modulatorów aktywności elektrycznej neuronów [2,4]. Badania wykazały także, że jony cynku modułują aktywność kanałów jonowych, między innymi, kanałów potasowych różnych typów [4]. Badania przeprowadzone w naszym laboratorium pozwoliły stwierdzić modulujący wpływ aplikacji jonów cynku na aktywność kanałów potasowych typu Kv1.3 [9]. Kanały te występują w limfocytach T, jak również m.in. w neuronach mózgowych [6,7]. Efekt modulacji polegał na przesunięciu

napięciowej zależności aktywacji i inaktywacji kanałów Kv1.3 w stronę dodatnich wartości potencjału błonowego, znaczącym spowolnieniu kinetyki ich aktywacji oraz zmniejszeniu amplitudy prądów potasowych w zależności od stężenia [9]. Przeprowadzone niedawno przez nas badania nad wpływem pH na wyżej wspomniany efekt pozwoliły stwierdzić, że efekt modulacji aktywności kanałów potasowych Kv1.3 przez jony cynku nie zależy od wartości zewnątrzkomórkowego pH [10] ani wewnątrzkomórkowego pH (wyniki nie publikowane) w zakresie od 6.4 do 8.4. Stwierdzono także, że obniżenie zewnątrzkomórkowego pH od 7.35 do wartości 6.4 powodowało przesunięcie napięciowej zależności aktywacji badanych kanałów w stronę dodatnich wartości potencjału błonowego, spowolnienie kinetyki aktywacji prądów potasowych oraz zmniejszenie ich amplitudy, przy czym efekt ten był addytywny do efektu wywieranego przez jony cynku [10]. Natomiast podwyższenie zewnątrzkomórkowego pH od 7.35 do 8.4 nie wpływało istotnie na aktywność kanałów Kv1.3 [10].

Aby móc wnioskować o możliwym fizjologicznym znaczeniu addytywnego efektu modulującego wywieranego przez jony cynku i protony w kwaśnym pH zaistniała potrzeba przeprowadzenia doświadczeń w warunkach fizjologicznych wartości pH oraz stężeń jonów cynku. Wartość zewnątrzkomórkowego pH równa 6.4 jest uważane za leżące poza zakresem fizjologicznym. Z tego względu przeprowadzono dodatkowo doświadczenia przy zewnątrzkomórkowym pH równym 6.8, które jest uważane za fizjologiczne w badaniach nad wpływem pH na blisko spokrewnione kanały potasowe Kv1.5 [11]. Badania przeprowadzono przy stężeniu jonów cynku równym 100 μM , które leży w zakresie stężeń osiąganych w warunkach fizjologicznych w centralnym układzie nerwowym [2, 4].

Materialy i metody

Ponieważ kanały potasowe Kv1.3 występują endogennie w dużej liczbie w limfocytach T, komórki te wykorzystywane były w naszych doświadczeniach jako układ modelowy. Doświadczenia prowadzono zarówno na komórkach izolowanych z krwi obwodowej dawców zdrowych przy zastosowaniu standardowej metody wirowania w gradiencie gęstości, jak również na komórkach linii komórkowej Jurkat E6-1.

Badania prowadzono z użyciem techniki patch-clamp w konfiguracji whole-cell [3]. Skład roztworów użytych w doświadczeniach był następujący (stężenia w mM): roztwór zewnątrzkomórkowy - 150 NaCl, 4.5 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 10 Glukozy; pH=7.35 lub 6.8, roztwór wewnątrzkomórkowy - 150 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 10 EGTA;

pH=7.2. Standardowy protokół doświadczalny zawierał 7 impulsów napięciowych przykładanych co 20 mV w zakresie od -60 mV do +60 mV, odstęp czasowy pomiędzy impulsami - 10 s; czas pojedynczego impulsu 40 ms, potencjał utrzymania - 90 mV. Badania przeprowadzone uprzednio w naszym laboratorium wykazały, że prądy jonowe rejestrowane w tych warunkach są związane z aktywacją kanałów potasowych typu Kv1.3 w limfocytach T [9]. Liniowa (omowska) składowa była odejmowana od mierzonego prądu z zastosowaniem procedury P/4.

Parametrem opisującym napięciową zależność aktywacji badanych kanałów była wartość potencjału, przy którym połowa kanałów ulegała aktywacji - V_n . Wartość tą obliczano z funkcji Boltzmann'a opisującej napięciową zależność znormalizowanego przewodnictwa potasowego limfocytów T: $gK(V) = gK_{max}/(1+\exp(-(V-V_n)/k_n))$; gdzie: gK_{max} - maksymalna wartość znormalizowanego przewodnictwa potasowego (równa 1), V - potencjał błonowy, k_n - współczynnik nachylenia krzywej. Na rysunkach przedstawiono przesunięcia wartości V_n pod wpływem zmiany pH oraz aplikacji jonów cynku w stosunku do wartości obliczonych przy pH=7.35 w nieobecności jonów cynku. Miarą szybkości aktywacji kanałów była stała czasowa aktywacji τ_n obliczana ze wzoru: $I(t) = I_{max}[1-\exp(-t/\tau_n)]^2$; gdzie: I - wartość mierzonego prądu, I_{max} - maksymalna wartość prądu, t - czas. Stałą τ_n obliczano dla wartości potencjału błonowego równych 20, 40 oraz 60 mV. W celu bardziej czytelnego przedstawienia wyników na rysunkach przedstawiono względne wartości τ_n . Wartości te obliczono jako stosunek wartości τ_n w danych warunkach eksperymentalnych do wartości obliczonej dla tej samej wartości potencjału przy pH równym 7.35 i w nieobecności jonów cynku.

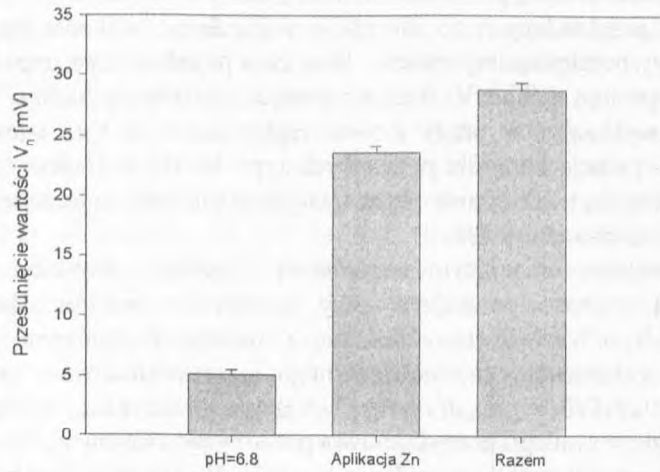
Wyniki przedstawiono jako średnia arytmetyczna \pm błąd standardowy.

Wszystkie doświadczenia wykonano w temperaturze pokojowej (22-24 °C).

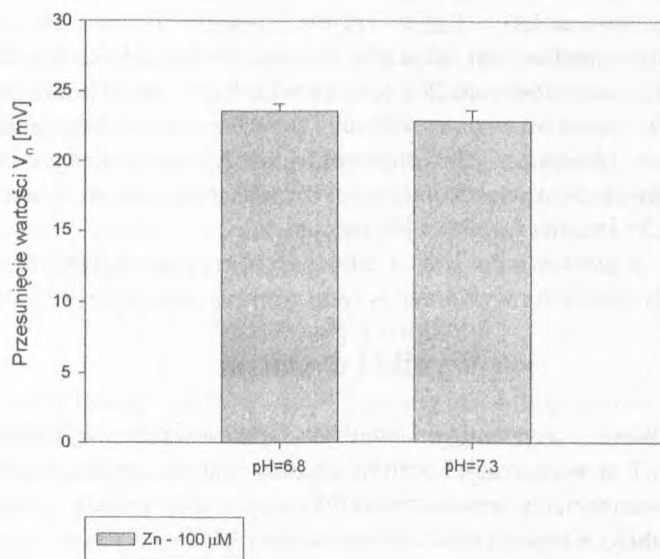
Wyniki i dyskusja

Przykładowe rejestracje prądów potasowych kanałów Kv1.3 w limfocytach T w warunkach kontrolnych oraz podczas aplikacji jonów cynku w różnych wartościach zewnątrzkomórkowego pH zostały przedstawione w pracach opublikowanych przez nas uprzednio [9,10].

Rycina 1 niniejszej pracy przedstawia przesunięcie wartości V_n w stronę dodatnich wartości potencjału błonowego przy zmianie pH z 7.35 do 6.8, podczas aplikacji jonów cynku w stężeniu 100 μ M przy pH=6.8 oraz obydwie czynniki razem wzięte. Zmiana pH powodowała przesunięcie wartości V_n



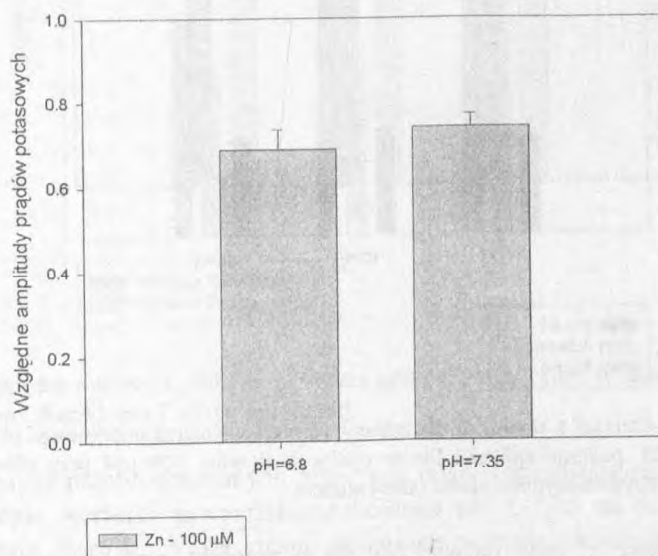
Ryc. 1. Przesunięcie wartości V_n pod wpływem zmiany wartości zewnątrzkomórkowego pH z 7.35 do 6.8, podczas aplikacji jonów cynku w stężeniu $100 \mu\text{M}$ przy pH=6.8 oraz przez obydwa czynniki razem.



Ryc. 2. Przesunięcie wartości V_n pod wpływem aplikacji jonów cynku w stężeniu $100 \mu\text{M}$ przy pH=6.8 oraz pH=7.35.

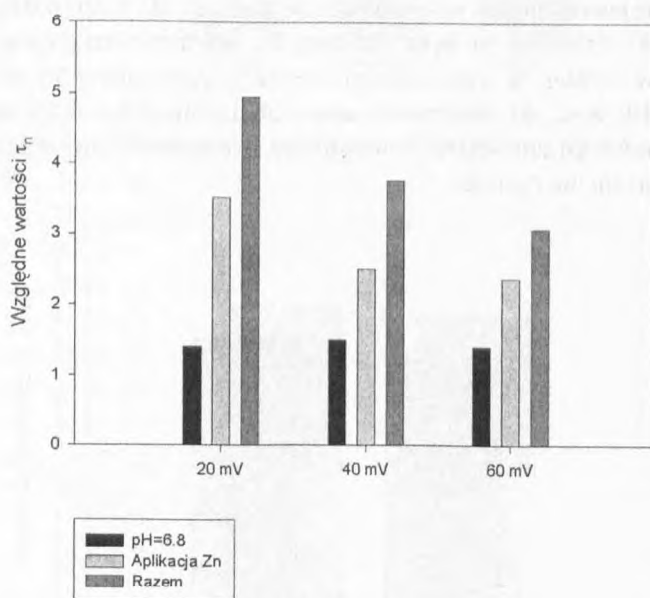
o 5.16 ± 0.4 mV ($n=8$), przesunięcie to jest statystycznie istotne ($p < 0.05$ - test t-Studenta). Aplikacja jonów cynku przy pH=6.8 powodowała dodatkowo przesunięcie wartości V_n o 23.56 ± 0.5 mV ($n=8$), natomiast całkowita wartość przesunięcia pod wpływem obydwu czynników wynosiła 28.72 ± 0.6 mV ($n=8$) i była istotnie większa ($p < 0.05$) od wartości otrzymanej podczas aplikacji jonów cynku. Przesunięcie wartości V_n pod wpływem aplikacji jonów cynku przy pH=6.8 było zbliżone do wartości przesunięcia przy pH=7.35, które wynosiło 22.83 ± 0.8 mV ($n=10$, Ryc. 2).

Wiadomo, że aplikacja jonów cynku powodowała również zmniejszenie amplitudy prądów potasowych [9]. Badania wykazały, że aplikacja jonów cynku w stężeniu $100 \mu\text{M}$ przy pH=6.8 powodowała zmniejszenie amplitudy prądów potasowych zarejestrowanych przy potencjale $+60$ mV do 0.69 ± 0.046 wartości kontrolnej ($n=8$). Wartość ta była zbliżona do wartości otrzymanej podczas aplikacji jonów cynku w tym samym stężeniu przy pH=7.35 wynoszącej 0.74 ± 0.03 ($n=10$, Ryc. 3). Natomiast samo obniżenie pH z 7.35 do 6.8 nie powodowało istotnego zmniejszenia amplitudy rejestrowanych prądów (wyniki nie zostały pokazane na rycinie).



Ryc. 3. Wartość względnej amplitudy prądów potasowych podczas aplikacji jonów cynku w stężeniu $100 \mu\text{M}$ przy pH=6.8 oraz pH=7.35.

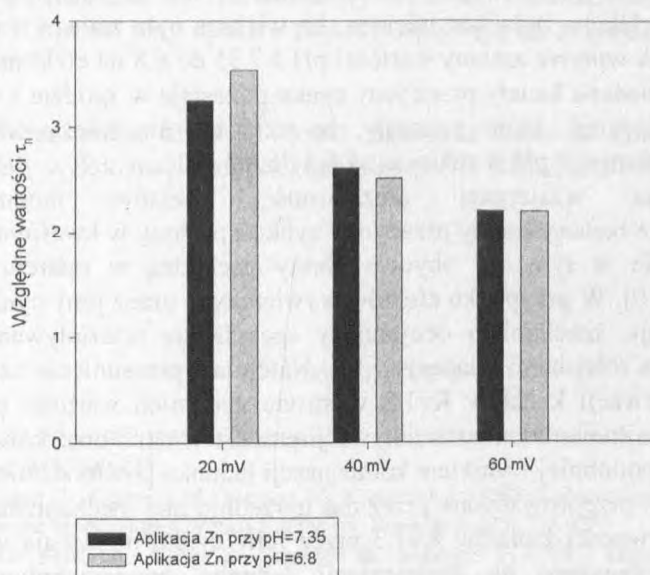
Jak wiadomo, zarówno obniżenie wartości zewnątrzkomórkowego pH jak też aplikacja jonów cynku powoduje spowolnienie szybkości aktywacji badanych kanałów. Rycina 4 przedstawia względne wartości stałych czasowych aktywacji (τ_n) prądów zarejestrowanych przy potencjałach błonowych +20, +40 oraz +60 mV. Obniżenie wartości pH z 7.35 do 6.8 spowodowało spowolnienie szybkości aktywacji kanałów, czego odzwierciedleniem był wzrost względnych wartości τ_n do poziomu 1.4-1.5 wartości kontrolnej. Wzrost ten był niezależny od potencjału błonowego w zakresie od +20 do +60 mV i był na pograniczu istotności statystycznej ($p=0.05$). Aplikacja jonów cynku w stężeniu 100 μM przy tej wartości pH powodowała dalszy wzrost względnej wartości τ_n aż do poziomu 3.08-4.95 wartości kontrolnej w zależności od potencjału błonowego.



Ryc. 4. Względne wartości τ_n obliczone dla zmiany wartości zewnątrzkomórkowego pH z 7.35 do 6.8 (czarny słupek), podczas aplikacji jonów cynku w stężeniu 100 μM przy pH=6.8 (jasny słupek) oraz przez obydwa czynniki razem (szary słupek).

Względna wartość τ_n była największa dla potencjału równego +20 mV, zaś najmniejsza przy +60 mV. Spadek ten był spowodowany tym, że efekt spowolnienia szybkości aktywacji badanych kanałów w wyniku aplikacji jonów cynku był zależny od wartości potencjału błonowego i malał wraz ze wzrostem potencjału (Ryc. 4). Całkowity wzrost względnej wartości τ_n pod wpływem zmiany wartości pH z 7.35 do 6.8 oraz aplikacji jonów cynku w stężeniu 100 μM był statystycznie istotnie większy ($p<0.05$) od wzrostu wartości

τ_n spowodowanego przez aplikację jonów cynku bez zmiany pH. Porównano również względne wartości τ_n obliczone podczas aplikacji jonów cynku przy pH równym 7.35 oraz 6.8 (Ryc. 5). Jak widać, pewne różnice tych wartości przy pH równym 6.8 oraz 7.35 pojawiły się jedynie przy potencjale błonowym równym +20 mV i wynikały raczej z dużego rozrzutu wyników otrzymanych przy pH=6.8. Ponadto, przy potencjałach błonowych równych +40 oraz +60 mV względne wartości τ_n obliczone dla obydwu wartości pH były niemalże identyczne. Generalnie można więc stwierdzić, że obniżenie pH z 7.35 do 6.8 nie wpływało na zwiększenie względnych wartości τ_n pod wpływem aplikacji jonów cynku.



Ryc. 5. Względne wartości τ_n obliczone podczas aplikacji jonów cynku w stężeniu 100 μM przy pH=6.8 (jasny słupek) oraz 7.35 (czarny słupek).

Wyniki przeprowadzonych przez nas doświadczeń pozwalają stwierdzić, że obniżenie wartości zewnątrzkomórkowego pH z 7.35 do 6.8 powodowało przesunięcie wartości V_n w stronę dodatnich wartości potencjału błonowego oraz spowolnienie kinetyki aktywacji badanych kanałów, co objawiało się zwiększeniem względnych wartości τ_n . Należy stwierdzić, że zarówno przesunięcie wartości V_n , jak również wzrost względnych wartości τ_n przy wartości pH=6.8 był znacznie mniejszy niż obserwowany wcześniej przy pH=6.4 [10]. Był jednak na tyle znaczący, by osiągnąć istotność statystyczną. Równocześnie stwierdzono, że obniżenie pH z 7.35 do 6.8 nie miało istotnego

wpływu na efekt przesunięcia wartości V_n , jak również na zmniejszenie amplitudy badanych prądów potasowych oraz na wzrost względnych wartości τ_n pod wpływem aplikacji jonów cynku w stężeniu 100 μM . Całkowite przesunięcie wartości V_n , jak również wzrost względnych wartości τ_n pod wpływem działania obydwu czynników było istotnie większe od zmian spowodowanych przez aplikację jonów cynku bez zmiany pH.

Otrzymane wyniki pozostają w zgodzie z wynikami doświadczeń przeprowadzonych na kanałach potasowych Kv1.3 przez Lee i Deutsch, którzy stwierdzili, że obniżenie zewnątrzkomórkowego pH powodowało przesunięcie napięciowej zależności aktywacji tych kanałów w stronę dodatnich wartości potencjału błonowego oraz spowolnienie kinetyki ich aktywacji, przy czym wielkość tych efektów była tym większa, im większa była zmiana wartości pH [1]. Z kolei brak wpływu zmiany wartości pH z 7.35 do 6.8 na efekt modulujący wywierany na badane kanały przez jony cynku pozostaje w zgodzie z wynikami naszych doświadczeń, które pokazały, że efekt ten nie zależy od wartości zewnątrzkomórkowego pH w zakresie od 6.4 do 8.4 [10].

Przyczyna wzajemnej niezależności efektów modulacyjnych wywieranych na badane kanały przez jony cynku i protony w kwaśnym pH tkwi prawdopodobnie w tym, że obydwa efekty zachodzą w oparciu o różne mechanizmy [10]. W przypadku efektów wywieranych przez jony cynku jest to, jak się sugeruje, mechanizm obejmujący specyficzne oddziaływania jonów cynku z dwoma miejscami wiążącymi [9]. Natomiast przesunięcie napięciowej zależności aktywacji kanałów Kv1.3 w stronę dodatnich wartości potencjału błonowego oraz spowolnienie ich aktywacji przez zewnątrzkomórkowe protony jest najprawdopodobniej wynikiem kompensacji ładunku powierzchniowego [1]. Z kolei badania przeprowadzone przez nas uprzednio nad mechanizmem efektu modulacji aktywności kanałów Kv1.3 przez jony cynku pozwalają wykluczyć mechanizm polegający na kompensacji ładunku powierzchniowego [9]. Generalnie można więc uznać, że miejsca oddziaływania jonów cynku i protonów na kanały Kv1.3 są prawdopodobnie różne.

Należy zauważyć, że wyniki te są sprzeczne z doniesieniami odnośnie kanałów potasowych napięciowo zależnych typu *Shaker* a nawet blisko spokrewnionych z kanałami Kv1.3 kanałami typu Kv1.5 [5,8,11]. W przypadku tych kanałów udowodniono, że jony cynku i protony oddziałują na te same miejsca wiążące zawierające histydynę [5,8,11]. Wykazano też, że w przypadku kanałów potasowych typu *Shaker* w wyniku konkurencji pomiędzy jonami cynku a protonami o miejsca wiążące efekt modulacyjny jonów cynku ulegał znacznemu osłabieniu w kwaśnym, zaś wzmocnieniu w alkalicznym pH [8]. Można zatem wnioskować, że mechanizmy oddziaływania

zewnątrzkomórkowego pH na efekt modulacyjny jonów cynku mogą być różne dla różnych typów kanałów potasowych.

Obserwowane doświadczalnie addytywne efekty modulacyjne wywierane przez protony w kwaśnym pH oraz jony cynku na kanały Kv1.3 mogą mieć potencjalnie znaczenie fizjologiczne. Wiadomo, że kanały Kv1.3 występują również w komórkach centralnego układu nerwowego, zwłaszcza w komórkach narządu węchowego, gdzie ich aktywność stabilizuje proces tonicznego generowania potencjałów czynnościowych [6]. Jak już wspomniano, stężenie jonów cynku równe 100 μM , jak również wartość pH równa 6.8 leży w zakresie osiąganym w centralnym układzie nerwowym w warunkach fizjologicznych. Pozostaje do zbadania, czy i na ile addytywne efekty modulacyjne wywierane na kanały Kv1.3 przez jony cynku i protony wpływają na aktywność elektryczną neuronów.

Doświadczenia, których wyniki zaprezentowano w ramach niniejszej pracy zostały wykonane w ramach realizacji grantu KBN Nr 2 PO5A 010 27.

Piśmiennictwo

1. Deutsch C., Lee S. (1989) Modulation of K⁺ currents in human lymphocytes by pH. *J. Physiol.* 413: 399-413.
2. Frederickson C., Klitenick M., Menton W., Kirpatrick J. (1983) Cytoarchitectonic distribution of zinc in the hippocampus of man and the rat. *Brain Res.* 273: 335-339.
3. Hamill O., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391: 85-100.
4. Harrison N., Gibbons S. (1994) Zinc: an endogenous modulator of ligand and voltage-gated ion channels. *Neuropharmacology* 33: 935-952.
5. Kehl S., Eduljee C., Kwan D., Zhang S., Fedida D. (2002) Molecular determinants of the inhibition of human Kv1.5 potassium currents by external protons and Zn. *J. Physiol.* 541: 9-24.
6. Kupper J., Prinz A., Fromherz P. (2002) Recombinant Kv1.3 potassium channels stabilize tonic firing of cultured rat hippocampal neurons. *Pflügers Arch.* 443: 541-547.
7. Shieh Ch., Coghlan M., Sullivan J., Gopalakrishnan M. (2000) Potassium channels: molecular defects, diseases and therapeutic opportunities. *Pharmacol. Rev.* 52: 557-593.
8. Spires S., Begenisich T. (1994) Modulation of potassium channel gating by external divalent cations. *J. Gen. Physiol.* 104: 675-692.
9. Teisseyre A., Mozrzymas J.W. (2002) Inhibition of the activity of T lymphocyte Kv1.3 channels by extracellular zinc. *Biochem. Pharmacol.* 64: 595-607.

10. Teisseyre A., Mozrzymas J.W. (2005) Influence of extracellular pH on the modulatory effect of zinc ions on Kv1.3 potassium channels. *J. Physiol. Pharmacol.* Praca przyjęta do druku.
11. Trapani J., Korn S. (2003) Effect of external pH on activation of the Kv1.5 potassium channel. *Biophys. J.* 84: 195-204.

Adres do korespondencji:

Andrzej Teisseyre
Akademia Medyczna we Wrocławiu
Katedra i Zakład Biofizyki
ul. Chałubińskiego 10
50-368 Wrocław
tel. (48 71) 784 14 14
e-mail: ateiss@biofiz.am.wroc.pl