

3. M.V. Šušić *J. Int. Hydrogen Energy*, 22 (1997) 585.
4. C. G. Carter and L. F. Carter, u *Metal-Hydrogen Systems*, ed. N.T. Veziroglu, Pergamon, Oxford, 1981.
5. H. Buchner, P. Pelloux-Gervais, M. Muller, F. Grafwalner and P. Luger, u *Hydrogen and Other Alternative Fuels for Air and Ground Transportation*, ed. W.H. Pohl, Wiley, Chichester, UG, 1995.
6. C.A. Dillon, M.K. Jones, A.T. Bekkedahl, C.H. Kiang, D.S. Bethune and J.M. Heben, *Nature* 386 (1997) 377.
7. Y. Ye, C.C. Ahn, c. Withman, B. Fultz, J. Liu, G. A. Rinzier, D. Colbert, A.K. Smith and R.E. Smalley, *Applied Physics Letters*, 74 (1999) 2307.
8. C. Liu, Y.Y. Fan, M. Liu, T.H. Cong, M.H. Cheng and S.M. Dresselhaus, *Science* 286 (1999) 1127.
9. A. Chambers, C. Park, K.T.R. Baker and M.N. Rodriguez, *J. Phys. Chem. B* 102 (1998) 4253.
10. P. Chen, X. Wu, J. Lin and L.K. Tan, *Science* 285 (1999) 91.
11. S. Iijima, *Nature* 354 (1991) 56.
12. J. Jagiello, J.T. Bandosz, K. Putyera, A.J. Schwarz, *J.Chem.Soc., Faraday Trans.* 91(1995) 2929.
13. G.A.K.Amankwah, A.J. Schwarz, *Int.J. Hydrogen Energy*, 14 (1989) 437.
14. D.M. Minic, M.V.Šušić, u *Hidridi kao akumulatori vodonika*, Serbian Academy of Science and Arts, Monographs, vol DCXLIV, No2 ed. S.Ribnikar, 1999.



Милош Милчић и Снежана Зарић, Хемијски факултет, Београд

ОДРЕЂЕНА ЈЕ СТРУКТУРА И ОТКРИВЕН МЕХАНИЗАМ СЕЛЕКТИВНОСТИ КАЛИЈУМОВОГ КАНАЛА

Калијумови канали имају централну улогу у функционисању скоро сваке живе ћелије. У нервном систему они контролишу фреквенцију нервних импулса. Калијумов канал веома је селективан за калијумов јон у односу на натријумов јон (10000:1). У исто време, калијумов канал постиже невероватан јонски флуks; у неким случајевима чак 10^8 јона прође кроз канал у секунди.

За свега десетак година, пређен је пут од потпуног незнања о калијумовом каналу до решене структуре и механизма његове селективности.

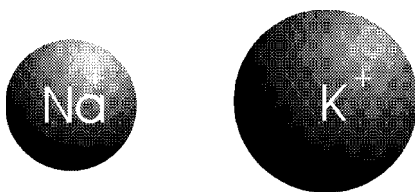
Јонски канали су протеини који омогућавају пролазак јона кроз ћелијску мембрану, која одваја унутрашњост ћелије од околине. Неполарна природа ћелијских мембрана чини их веома непропусним за већину јонских и поларних супстанци. Оне могу ући у ћелију једино уз помоћ специфичних транспортних протеина или молекула. Такви протеини су медијатори јона (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} и Cl^-) и метаболита (пируват, аминокиселине, шећери, нуклеотиди) кроз мембрану.

Део најимпресивније хемије у живих система обављају протеини мембране ћелија нервних система: јонски канали, неурорецептори и транспортери неуротрансмитера. То су молекули мишљења, памћења и опажања. Са хемијске тачке гледишта зна се јако мало о тим молекулима, поготово о структурним детаљима који утичу на њихову функцију. Разлог овог незнања је једноставан: структурне методе високе резолуције као што су рентгенска кристалографија и NMR спектроскопија веома су мало примењиве на протеинске мембране. Управо због тога што се тешко може одредити структура тих протеина научници морају на основу неких других података

да постављају разне хипотезе у вези са начином функционисања тих протеина. Тако је било и у, више од једне деценије дугој, потрази за објашњењем високе селективности и пропустљивости калијумовог канала.

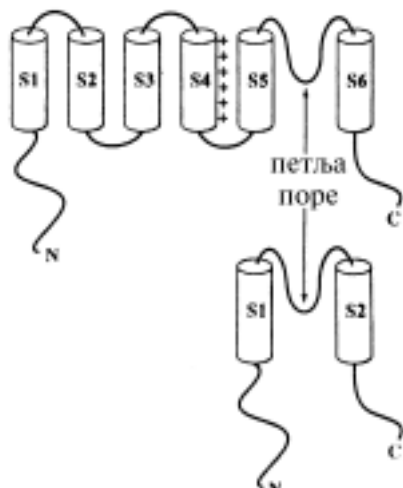
Калијумов канал има централну улогу у функционисању скоро сваке живе ћелије. У ћелијама нервних система он регулише акциони потенцијал и одређује мембрански потенцијал у мировању, и на тај начин управља фреквенцијама нервних импулса. У кардиоваскуларном систему, калијумов канал регулише дужину и фреквенцију откуцаја срца. Он, такође, контролише пролазак воде и соли кроз мембране бубрега, душника и црева.

Шта ради калијумов канал? Он, насупрот градијенту концентрације убацује калијумов јон у ћелију. Проблем је како спречити остале јоне који се налазе у ванћелијској течности да уђу у ћелију. Јони чији је полупречник већи од калијумовог су, логично, исувише велики да прођу кроз канал. Међутим, јон који се у највећој концентрацији јавља у ванћелијској течности, а кога треба спречити да уђе у ћелију је натријумов јон. Натријумов јон је мањи од калијумовог (јонски радијус K^+ је 1,33 Å, а Na^+ је 0,95 Å, слика 1). Овде се природа суочила са проблемом како мању честицу задржати изван ћелије а већу пропустити унутра и, наравно, успешно га решила јер је калијумов канал веома селективан за калијумов јон у односу на натријумов јон (10000:1). У исто време, калијумов канал одржава невероватан јонски флуks: скоро 10^8 јона прође кроз један отворен канал у секунди. Хемичари обично изједначавају високу селективност са чврстим везивањем, међутим, природа је пронашла начин да постигне прво без другог.



Слика 1. Релативне величине калијумовог и натријумовог јона

Пре 1987. године није се знало готово ништа о структури калијумовог канала. Тада, независно једна од других, три лабораторије успевају да изолују из мутанта винске мушице калијумов канал [1]. Након тога интересовање за ову ствар нагло расте. Откривено је да постоје два различита типа калијумових канала. Први тип се отвара или затвара као одговор на промене потенцијала ћелијске мембране, док други тип дозвољава проток калијумових јона само у унутрашњост ћелије, наспрот градијенту концентрације. Функционални калијумов канал састоји се од 4 протеина од којих је један приказан на слици 2. Регије поре сва четири протеина стоје тако да оцртавају улаз у јонски канал.

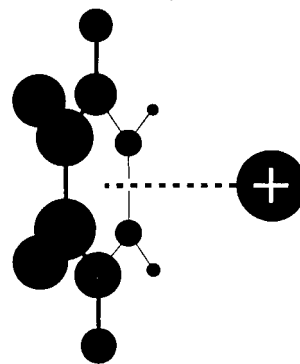


Слика 2. Предвиђене топологије две фамилије калијумовог канала засноване на анализи аминокиселинске секвенце и биохемијским проучавањима. Код обе фамилије С и N терминали су у унутрашњости ћелије. Оба ова канала имају петљу поре- конзервирану секвенцу која чини селективни филтер.

Следећа ствар коју је требало урадити било је одређивање редоследа аминокиселина у овим протеинима. Посебно интересовање било је за аминокиселине које се налазе у региону поре, који је очигледно одговоран за селективност канала. Секвенца у том делу је: ...Ala-Phe-Trp-Trp-Ala-Val-Val-Thr-Met-Thr-Thr-Val-Gly-Tyr-Gly-Asp-Met-Thr... [2] (задебљана слова означавају конзервисане аминокиселине). У овој секвенци уочљиво је да преовлађују аминокиселине са хидрофобним бочним остатком, што је помало чудно за један катјонски канал. Много логичније би било да се у каналу налазе негативно наелектрисане аминокиселине. Такође је интересан-

тан велики број конзервисаних ароматичних аминокиселина (Phe, Trp и Tyr) у региону поре.

Мак Кинон (McKinnon) и сарадници претпоставили су да су можда привлачне интеракције између катјона и електрон богатог лица ароматичног прстена (катјон- π интеракције) (Слика 3) "одговорне" за селективност калијумовог канала [3,4]. У прилогу им је ишла чињеница да је део који је најодговорнији за селективност канала управо конзервирана секвенца... Gly-Trp-Gly... (GYG). Уколико се тирозин замени неком другом аминокиселином канал изгуби своју селективност. Претоставка је била да се на улазу у канал налазе четири фенил групе из четири тирозина (од сваког протеина који чине канал по један) који катјон- π интеракцијама извлаче јон калијума из своје хидратационе љуске и "убацују" га у унутрашњост канала. Међутим, када је одређена структура калијумовог канала овај механизам је одбачен.



Слика 3. Катјон- π интеракције

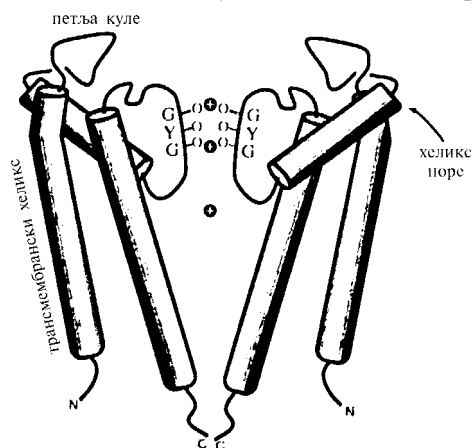
Друга претпоставка у вези са селективношћу калијумовог канала [2] је да карбоксилни кисеоникови атоми из пептидног ланца формирају филтер тачно одређених димензија за комплексирање калијумовог јона. Решавањем структуре калијумовог канала ова претпоставка је потврђена.

Први проблем који је требало решити да би се добила структура високе резолуције је прибављање већих количина протеина. Шремп (Schrempf) и сарадници [5] су 1995. године објавили да су идентификовали и окарактерисали калијумов канал из бактерије *Streptomyces lividans*. Иако бактерија није неурон, било је очигледно да је овај бактеријски канал (назван KcsA) довољно сличан еукариотском калијумовом каналу и да имају исте кључне структурне елементе. Даље, овај бактеријски канал је веома отпоран, тако да се лако уграђује у вештачку мембрану; чињеница да је то бактеријски канал омогућила је његово добијање у чистом облику у већим количинама.

Чак и са великим количинама протеина није било лако добити структуру. Кристали су осетљиви на радијацију, дифрактују X-зраке анизотропно и било је потребно направити низ мутаната да би се направило место за везивање тешких атома. Коначно 1998. године Мак Кинон и сарадници [6] су успели да сниме структуру KcsA канала при резолуцији од 3,2 Å. Треба рећи да 3,2 Å није висока резолуција по данашњим стандардима макромолекуларне кристало-

графије. Пептидни ланац је видљив али индивидуалне карбонил групе не могу се уочити. Бочни аминокиселински остаци су видљиви, али са минималним детаљима. Ипак, овако снимљена структура имала је одлучујућу улогу у откривању механизма транспорта јона кроз канал.

KcsA канал састоји се из 4 протеинске подјединице, а свака од њих од два трансмембранска домена. Структура показује да су ти домени у облику α хеликса (слика 4). Осам хеликса (по два од сваке подјединице) омотавају се око централне поре и при том се мало накривљују и извијају да би се отворили као цвет ка спољашњој (ванћелијској) површини канала (слика 4). Иначе, за већину мембранских протеина уобичајено је да је део који пролази кроз мембрану у облику α хеликса. Из структуре су још уочљива два слоја ароматичних аминокиселина на граничној области мембрана-вода. Структура је у складу са свим биохемијским студијама које су спроведене на KcsA каналу. На пример, остаци који учествују у блокади канала помоћу реагенса унетог у хелију окренути су ка унутрашњости хелије; остаци који учествују у блокади канала помоћу реагенса (агитоксин2) примењеног изван хелије налазе се у региону куле који се налази изван хелије (слика 4). N и C терминални



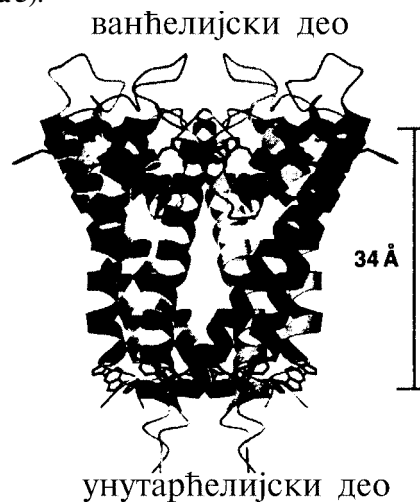
Слика 4. Шематски приказ структуре калијумовог канала. Две од четири подјединице су приказане; остале две леже изнад и испод равни папира. Где дајући од N терминала свака подјединица садржи: трансмембрански α хеликс; петљу "куле" која садржи места за која се везују токсини; хеликс поре; петљу Gly-Tyr-Gly (GYG); велики C терминални α хеликс. Такође су приказана три калијумова јона који одговарају местима где се они у структури налазе. Два леже у GYG петљама док се трећи налази у воденом "базену".

део налази се у унутрашњости хелије.

Део протеинског ланца који чини регион поре прави петљу која се састоји од малог хеликса, хеликса поре, а затим окрет на коме се налази пресудна Gly-Tyr-Gly секвенца. Одавде је могуће видети на којој страну је усмерен тирозински бочни остатак и закључити који од предложених механизма је тачан.

Видљиво је да је тирозински бочни остатак усмерен од канала ка протеину, и није у могућности

да гради катјон- π интеракцију са јонима калијума који пролазе кроз канал. Иако се индивидуални атоми пептидног ланца не могу видети, аутори су направили разумну претпоставку да су карбонилни кисеонични атоми окренути ка унутрашњости канала. Три суседне карбонилне групе из сваке подјединице образују прстен кисеоникових атома који дефинише место за везивање катјона. Очигледна је аналогија са крунским етрима који служе за транспорт јона кроз мембрану. Натапање кристала са Rb^+ јонима (чија се пропустљивост кроз мембрану може мерити) и израчунавање разлике електронских густина омогућило је идентификацију места где се јони налазе (слика 5).



Слика 5. Тродимензионална структура канала

Остало је још неколико питања. Како оваква структура чини канал толико селективним за калијум? Зашто је тирозин конзервиран и толико битан за селективност канала када његов бочни остатак не учествује у молекулском препознавању?

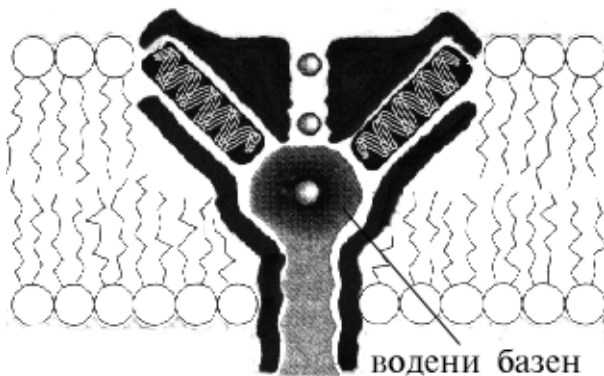
Аутори су предложили да остатак протеина има улогу да одржава Gly-Tyr-Gly карбонилне групе у оптималном положају за везивање K^+ јона, и да спречава структуру да се прилагоди за везивање Na^+ јона. То је веома тешко учинити за један тетрамерни протеин који се налази уроњен у хелијску мембрану. За то је задужен управо тирозин. Он се водонично везује за триптофан из хеликса поре и ступа у повољне ван дер-Валсове интеракције са другим триптофаном из хеликса поре суседне подјединице. Овакво уређивање пренесено на све четири подјединице даје "један велики прстен ароматичних аминокиселина" које чине "слој опруга" које држе карбонилне кисеоникове атоме на оптималном растојању за везивање калијумовог јона. Нађено је да је триптофан у хеликсу поре такође конзервиран у свим калијумовим каналима. Цео овај део калијумовог канала је назван селективни филтер.

Селективни филтер најужи је део канала и он се налази на ванћелијској страни канала. Многи су предвидели да би канал требало да има облик пешчаног сата, са најужим делом у средини. Електростатичка израчунавања показала су да када се јон креће

кроз мембрану, он мора проћи кроз енергетску баријеру која је највећа у средини мембране [7]. Диелектрична константа средине је ту најмања, и то је једна веома неповољна ситуација у којој јон може да се нађе. Наравно, природа је нашла решење за тај проблем. Одмах испод селективног филтера канал се шири, правећи шупљину са хидрофобним зидовима која садржи "базен" воде (слика 6). Јон који се налази у том делу канала солватисан је молекулима воде који се налазе у шупљини. Поред тога С-терминални део сва четири хеликса поре усмерен је ка овој шупљини. На тај начин диполи тих хеликса [8] додатно стабилизују јон у шупљини.

Објаснили смо како калијумов канал постиже велику селективност, остало је још да се објасни како постиже велики флуks (10^8 јона по секунди). Као што се види са слика 4 и 6, у каналу се налази више јонова у истом тренутку. Модел за велики флуks јона је: један јон се веже за селективни филтер, затим се веже и други јон за суседно место [9]. Везивање другог јона дестабилизује први јон електростатички - истоимена наелектрисања се одбијају. То гура први јон дубље у канал ка шупљини, други јон заузима његово место у селективном филтеру, а нови јон улази. Цео процес води велика концентрација калијума у физиолошком раствору. Најновији прорачуни [10] методом молекулске динамике показали су да се процес транспорта јона кроз канал одвија у две фазе. Разлика у слободној енергији између ова два стања је 5 kcal/mol чиме је омогућен брзи проток јона кроз канал.

Очекује се да ће структура ускоро бити решена са бољом резолуцијом која ће омогућити откривање свих детаља у структури, и да ће тада све недоумице бити отклоњене. Такође, било би интересантно и поучно упоредити колико су мотиви из калијумовог канала искоришћени у другим јонским каналима попут натријумовог или калцијумовог канала.



Слика 6. Два механизма по којима калијумов канал стабилизује катјон у средини мембране. Први, водени "базен" стабилизује јон у иначе хидрофобној унутрашњости мембране. Други, хеликси поре оријентишу негативни крај свог дипола ка шупљини у којој се налази јон.

Abstract

RESOLVED STRUCTURE AND SELECTIVITY MECHANISM OF A POTASSIUM CHANNEL

Miloš Milčić i Snežana Zarić

Faculty of Chemistry, Belgrade

Potassium Channels play a central role in the function of nearly every living cell. In the nervous system they govern the frequency of nerve impulses. The Potassium Channels are highly selective—perhaps as much as 10000:1 for K^+ over Na^+ , despite the minimal structural difference between the two. At the same time, Potassium channels promote tremendous ion flux; in some cases on the order of 10^8 ions per second pass through a single open channel.

In little more than a decade, we have come from almost complete ignorance about the molecular nature of Potassium channels to a high-resolution structure and mechanism for its selectivity.

ЛИТЕРАТУРА

1. A. Baumann, I. Krah-Jentgens, R. Muller, F. Muller-Holtkamp, R. Seidel, N. Kecskemethy, J. Casal, A. Ferrus, O. Pongs, *EMBO J.* **1987**, 6, 3419; A. Kamb, L.E. Iverson, M. A. Tanouye, *Cell* **1987**, 50, 405; D. M. Papazian, T. L. Schwarz, B. L. Tempel, Y. N. Jan, L. Y. Jan, *Science* **1987**, 237, 749.
2. L. Heginbotham, Z. Lu, T. Abramson, R. MacKinnon, *Biophys J.* **1994**, 66, 1061.
3. L. Heginbotham, R. MacKinnon, *Neuron* **1992**, 8, 483.
4. R. A. Kumpf, D. A. Dougherty, *Science* **1993**, 261, 1708.
5. H. Schrempf, O. Schmidt, R. Kummerlen, S. Hinnah, D. Muller, M. Betzler, T. Steinkamp, R. Wagner, *EMBO J.* **1995**, 14, 5170.
6. D. Doyle, J. M. Carbal, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait, R. MacKinnon, *Science* **1998**, 280, 69.
7. V. A. Parsegian, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1975**, 264, 161.
8. D. Sali, M. Bycroft, A. R. Fersht, *Nature* **1988**, 335, 740; J. Aqvist, H. Luecke, F. A. Quirocho, A. Warshel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, 88, 1026; D. J. Lockhart, P. S. Kim, *Science* **1992**, 257, 947.
9. H. A. Lester, D. A. Dougherty, *J. Gen. Physiol.* **1998**, 111, 181.
10. J. Aqvist, V. Luzhkov, *Nature* **2000**, 404, 881

АНЕГДОТЕ ИЗ ЖИВОТА ПОЗНАТИХ НАУЧНИКА

Истакнути мађарски биохемичар – нобеловац Алберт Сент-Берђи открио је витамин Ц готово случајно, пошто се бавио истраживањима која у почетку нису имала никакве везе са витаминима. Своје откриће описао је, у шаљивом тону, овако: »Постао сам отац не желећи то, отац витамина. Такве случајности вероватно имају места у науци«.