XXXII Неделя науки СПбГПУ. Материалы межвузовской научно-технической конференции. Ч.IV : С.89
© Санкт-Петербургский государственный политехнический университет, 2004

УДК 577.352

А.Ю.Скопин (5 курс, каф. БФ), А.В.Николаев, асп. (ИНЦ РАН),
Е.В.Казначеева, д.б.н., в.н.с (ИНЦ РАН), Г.Н.Можаева, д.б.н., проф. (ИНЦ РАН)

ИССЛЕДОВАНИЕ ИНОЗИТОЛ(1,4,5)ТРИФОСФАТ АКТИВИРУЕМЫХ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ В КЛЕТКАХ ЛИНИИ HEK293

Воздействие агонистов, сопряженных с фосфолипазой С, на многие типы невозбудимых клеток приводит к выбросу кальция из внутриклеточных хранилищ вследствие увеличения концентрации вторичного посредника IP_3 в цитоплазме. Опустошение внутриклеточных кальциевых депо активирует каналы, ответственные за вход кальция через плазматическую мембрану. Эти каналы называются депо-управляемыми каналами (SOC). Механизмы активации SOC не вполне ясны. Для выяснения механизмов депо-управляемого входа кальция в клетку необходимо проводить структурно-функциональные исследования каналов SOC.

Ранее сотрудниками нашей лаборатории на клетках линии A431 были описаны высокоселективные и низкопроводящие кальциевые каналы I_{min}. Они активируются уридин-трифосфатом (УТФ) с внешней и инозитол(1,4,5)трифосфатом (IP_3) с внутренней стороны плазматической мембраны при пассивном опустошении кальциевых депо тапсигаргином. Их проводимость составляет порядка 1 пСм, а селективность по кальцию относительно калия порядка 1000:1.

На клетках линии A431 структурно-функциональные исследования I_{min} каналов усложнены, так как эти клетки не позволяют проводить трансфекцию с большей эффективностью. Для продолжения исследований необходимо было использовать клетки, в которых хорошо происходит экспрессия экзогенных белков. Для этих целей многие группы используют клетки линии HEK293. Они позволяют проводить кальций-фосфатную трансфекцию или трансфекцию липофектамином с высокой эффективностью. Нашей целью было показать наличие канала I_{min} в клетках HEK293 с помощью метода локальной фиксации потенциала на мембране в конфигурациях cell-attached и inside-out.

Воздействие УТФ с внешней стороны плазматической мембраны клеток линии HEK293 привело к возникновению канальных токов входящего направления. После подачи IP_3 с внутренней стороны плазматической мембраны также возникли входящие токи малой амплитуды. После построения вольтамперных характеристик было установлено, что как подача УТФ с внешней стороны, так и подача IP_3 с внутренней стороны клеточной мембраны активируют один и тот же тип ионных каналов. Значение проводимости для этих каналов составило 1,2±0,1 пСм, потенциала реверсии более 50 мВ.

Сопоставление вольтамперных характеристик полученных каналов с таковыми, полученными ранее для клеток линии A431 (значение потенциала реверсии и проводимости, и зависимости активности исследуемых каналов от мембранного потенциала) позволяют заключить, что в клетках линии HEK293 экспрессирован канал I_{min}. В свою очередь, это позволяет продолжить электрофизиологические исследования I_{min}, и начать их структурно-функциональные исследования.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант ”Ведущие научные школы” НШ – 2178.2003.4.