

УДК 577.352

А.В.Шалыгин (4 курс, каф. БФ), В.В.Бугай, к.б.н., н.с. ИЦ РАН

### РЕЦЕПТОР-УПРАВЛЯЕМЫЙ ВХОД ИОНОВ $Ca^{2+}$ В КЛЕТКАХ ЛИНИИ НЕК293 (HUMAN EMBRYONIC KIDNEY CELLS)

Кальций регулирует такие важные клеточные процессы, как секреция, дифференцировка, пролиферация, апоптоз, генная регуляция и другие. Повышение концентрации ионов кальция в цитозоле является одним из основных способов передачи сигнала от рецепторов плазматической мембраны к внутриклеточным системам. Этот процесс может осуществляться двумя путями: как за счет быстрого выброса ионов кальция из внутриклеточных депо, так и за счет продолжительного входа ионов кальция через каналы плазматической мембраны из наружной среды. Работа посвящена изучению путей входа  $Ca^{2+}$  в клетках НЕК293 в ответ на приложение кальций-мобилизующих агонистов.

В опытах использован метод локальной фиксации потенциала на мембране (patch-clamp method) в конфигурации, при которой регистрируются токи через ограниченный пипеткой фрагмент мембраны клетки в нативных условиях (cell-attached configuration). Добавление к раствору, омывающему клетку, 100 мкМ уридинтрифосфата (УТР) приводило к активации каналов. Проводимость каналов составляла 17 пСм. Положительный потенциал реверсии указывает на селективность канала для двухвалентных катионов относительно калия. Канал имел два характерных времени открытого состояния. При потенциале на мембране  $-70$  мВ канал открывался в среднем на 2.1 мс или 32 мс. В конфигурации cell-attached фрагмент мембраны, заключенный под регистрирующей пипеткой, не доступен для агониста. Следовательно, вход кальция вызывается каким-то водорастворимым внутриклеточным посредником. Таким посредником может быть инозитол 1,4,5-трисфосфат ( $IP_3$ ), поскольку связывание агониста с рецептором, сопряженным с G белком, активирует фосфолипазу C (PLC), и активированная PLC катализирует гидролиз фосфатидинозитола 4,5-бисфосфата ( $PIP_2$ ) с образованием мембраносвязанного диацилглицерина (DAG) и водорастворимого  $IP_3$ .

Было логично проверить, могут ли активироваться эти каналы при увеличении концентрации  $IP_3$  в клетке. Для этого использовали конфигурацию, когда в раствор экспериментальной камеры обращена внутриклеточная поверхность изолированного фрагмента мембраны (inside-out configuration). При добавлении 2,5 мкМ  $IP_3$  в раствор, омывающий цитоплазматическую сторону мембранного фрагмента, наблюдали появление токов, основные электрофизиологические характеристики которых совпадали с токами, вызванными УТР.

Известно что связывание УТР с рецептором плазматической мембраны в клетках линии НЕК 293 вызывает опустошение  $Ca^{2+}$  депо, представленного, вероятно, примембранным субкомпартментом эндоплазматического ретикулума (ЭР). Мы проверили возможность активации этих каналов пассивным опустошением депо. В раствор, омывающий клетку, в конфигурации cell-attached добавляли  $Ca^{2+}$  - хелатор N, N, N', N' - тетраис (2-пиридилметил) этилендиамин (TPEN) в количестве 1мМ. Проникающий через мембраны TPEN приводит к пассивному опустошению  $Ca^{2+}$  депо. Как показывают результаты, при такой постановке эксперимента активировались те же каналы, что и при действии УТР или  $IP_3$ . Таким образом, исследуемый канал относится к депо-управляемым каналам.

Ранее в [1,2] были описаны высокоселективные и низкопроводящие кальциевые каналы  $I_{\min}$  в клетках линии А431, активирующиеся УТР,  $IP_3$  и пассивным опустошением  $Ca^{2+}$  депо. Для них показана модель конформационного сопряжения [3]. По аналогии с этими результатами можно предположить, что при изменении конформации молекулы рецептора инозитола 1,4,5-трисфосфата ( $IP_3R$ ), посредством белок-белкового взаимодействия передается сигнал к открыванию кальциевого канала проводимостью 17 пСм. Это конформационное изменение может происходить как за счет непосредственного взаимодействия  $IP_3$  с  $IP_3R$ , так и из-за уменьшения концентрации кальция в  $Ca^{2+}$  депо, что изменяет конформацию  $IP_3R$ . Однако для подтверждения этой гипотезы требуются дальнейшие исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 04-04-49057, 04-04-49053), программы исследований ведущих научных школ (проект НШ-2178.2003.4), программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. K.I.Kiselyov, S.B.Semyonov, A.G.Mamin, G.N.Mozhayeva. Pflügers Arch., v.437, p.305 (1999).
2. E.Kaznacheeva, A.Zubov, A.Nikolaev, V.Alexeenko, I.Bezprozvanny, G.Mozhayeva. J. Biol. Chem., v.275, p.4561 (2000).
3. E.Kaznacheeva, A.Zubov, K.Gusev, I.Bezprozvanny, G.Mozhayeva. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.98, p.148 (2001).