

Na^+ –КАНАЛЫ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ (ENaC)

На основании электрофизиологических и молекулярно-биологических данных в последние годы формируются представления об обширном семействе катионных каналов, преимущественно проницаемых для ионов натрия, общим свойством которых является отсутствие потенциал-зависимого механизма активации и инактивации. В отличие от давно известных и детально изученных потенциал-активируемых каналов (voltage-gated channels в англоязычной литературе) возбудимых мембран, потенциал-независимые (non-voltage-gated) натриевые каналы не имеют связанного с воротной структурой сенсора напряжения.

Основная цель данного исследования — изучение с помощью метода патч-кламп функциональных характеристик потенциал-независимых натриевых каналов на основе модели, полученной методом трансфекции плазмид, содержащих гены, кодирующие субъединицы натриевого канала и зеленого флуоресцентного белка, в культивируемые клетки HeLa и CHO. Эпителиальный натриевый канал (ENaC) образован тремя гомологичными субъединицами — α , β и γ . Субъединицы ENaC содержат от 632 до 698 аминокислотных остатков, молекулярная масса субъединиц составляет примерно 90 кДа. Наиболее вероятно, что нативный ENaC представляет собой гетеротетрамер, образованный двумя α -, одной β - и одной γ -субъединицами, располагающимися вокруг поры канала, в котором две альфа-субъединицы располагаются друг напротив друга. [1]

В работе использован метод локальной фиксации потенциала на мембране (метод patch-clamp). В этом методе тонкая стеклянная микропипетка соответствующей формы при помощи микроманипулятора плотно прижимается к клеточной мембране, изолируя тем самым небольшой ее участок (патч). Затем, в зависимости от решаемой задачи, используются различные варианты работы с клеткой. В режиме cell-attached исследуется активность ионных каналов в ограниченном пипеткой фрагменте мембраны нативной клетки. Также проводятся исследования в конфигурации whole-cell, которая позволяет регистрировать активность всей клеточной мембраны. Контрольные электрофизиологические эксперименты проводились на нетрансфицированных клетках HeLa и CHO в конфигурации cell-attached. Исследования на нативных клетках показали, что в клетках HeLa и CHO не содержится натриевых каналов типа ENaC.

Первый этап работы на клетках линии HeLa заключался в трансфекции этих клеток плазмидой, содержащей ген, кодирующий альфа-субъединицу натриевого канала мыши, и регистрации электрической активности этой субъединицы. Эксперименты на трансфицированных клетках в конфигурации whole cell показали, что интегральные токи от мембраны трансфицированных клеток HeLa сильно уменьшаются при добавлении в раствор амилорида (характеристического блокатора ENaC, [2]) в концентрации 10 мкМ. Электрофизиологические эксперименты на трансфицированных клетках HeLa в конфигурации cell-attached позволили зарегистрировать активность каналов, потенциал реверсии которых, согласно линейной аппроксимации ВАХ, лежит в районе +22 мВ, проводимость канала 22 пСм. Такая проводимость является довольно большой для натриевых каналов типа ENaC, и это, возможно, объясняется тем, что в данном случае канал формирует только альфа-субъединица, проводимость ионов натрия через которую, вероятно, возрастает в отсутствие других субъединиц. В клетки CHO были трансфицированы плазмиды, содержащие гены, кодирующие три субъединицы α , β и γ натриевого канала ENaC и ген зеленого флуоресцентного белка EGFP-F (в качестве маркера котрансфекции). Затем в конфигурации cell-attached на мембранах флуоресцирующих клеток проводилась

регистрация кинетических характеристик гиперэкспрессированных каналов. Анализ биофизических свойств каналов, обнаруженных на сделанных записях, позволил отнести их к типу ENaC (классификацию каналов типа ENaC см. [3]). Эксперименты на обеих клеточных линиях показали, что с изменением потенциала, подаваемого на мембрану, в положительную область (от -100 мВ до +40 мВ с шагом 10 мВ), вероятность открытого состояния канала снижается. В области мембранного потенциала выше +10 мВ активности канала зарегистрировано не было. Следует отметить, что имеющиеся данные являются приоритетными, так как в литературе нет данных о регистрации токов эпителиальных натриевых каналов в диапазоне потенциалов менее -60 мВ.

Полученные результаты в дальнейшем будут полезны для решения фундаментальных проблем внутриклеточной сигнализации, выяснения значимости мембранных механизмов в регуляции роста, дифференцировки и трансформации клеток. Так, могут быть выявлены ключевые пути регуляции ионных каналов. В результате проведенных исследований может быть разработана адекватная экспериментальная модель для анализа функций каналов в норме и патологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ 05-04-48209, 07-04-00679.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Benos D.J., Fuller C.M., Shlyonsky V.G., Berdiev B.K., Ismailov I.I. 1997. *News Physiol. Sci.* 12 : 55-61.
2. Benos D.J., Awayda M.S., Ismailov I.I., Johnson J.P. *Membrane Biology.* - 1995. 143, 1-18.
3. Palmer L.G. *Annu. Rev. Physiol.* 1992. V. 54. P. 51-66.