

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ТРАНСПОРТА Na^+ В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ СИСТЕМАХ. I. ЭПИТЕЛИАЛЬНЫЕ Na^+ -КАНАЛЫ

© А. В. Мельницкая, З. И. Крутецкая, О. Е. Лебедев

Кафедра биофизики С.-Петербургского государственного университета;
электронный адрес: zoya@mail.bio.pu.ru

В обзоре обобщаются современные представления о структурно-функциональной организации и механизмах регуляции транспорта Na^+ в эпителиальных системах. Детально рассмотрены структура, функции, регуляция и патология эпителиальных Na^+ -каналов, играющих ключевую роль в поддержании Na^+ -гомеостаза и регуляции кровяного давления.

Ключевые слова: транспорт Na^+ , эпителиальные системы, амилорид-чувствительные Na^+ -каналы.

Исследование механизмов трансэпителиального транспорта веществ является интенсивно развивающимся направлением современной биофизики, физиологии и медицины. Для практической медицины большой интерес имеет изучение транспорта ионов в почке, являющейся уникальным органом по разнообразию, интенсивности и избирательности транспортных процессов, а также по многообразию механизмов их селективного регулирования. Ведущую роль в поддержании функциональной способности почки и ряда других эпителиальных тканей (основной составляющей которых является поляризованная клетка, асимметричная по своим структурным и функциональным характеристикам) играют различные транспортные процессы, осуществляемые при участии клеточных мембран. Ряд серьезных технических трудностей, возникающих при проведении экспериментов по исследованию деятельности почек в условиях *in vivo*, предопределил широкое применение различных модельных объектов для изучения транспорта веществ через эпителиальные клетки. Классическими модельными объектами для исследования механизмов транспорта ионов через биологические мембраны являются кожа и мочевой пузырь амфибий. По способности к транспорту электролитов и реакции на некоторые гормоны кожа и мочевой пузырь амфибий сходны с дистальными отделами почечных канальцев (Наточин, Чапек, 1976), что позволяет использовать данные, получаемые на этих объектах, для выяснения механизмов трансэпителиального транспорта воды и ионов в клетках почки.

Активный транспорт Na^+ против градиента концентрации характерен для многих типов эпителиальных тканей. В собирательных трубках почки реабсорбция Na^+ является важнейшим механизмом поддержания электролитического и водного гомеостаза и, следовательно, кровяного давления. Концентрация Na^+ в плазме определяет объем крови и жестко регулируется путем регуляции транспорта Na^+ через эпителий почки.

В легких транспорт Na^+ играет важную роль в регуляции объема и состава жидкости, омывающей воздухо-

носные пути. В момент рождения Na^+ (и, следовательно, жидкость) транспортируется из полости воздухоносных путей в кровь, превращая легкие из органа, наполненного жидкостью, в орган, наполненный газом, что облегчает газообмен (Hummler et al., 1996; O'Brodivich, 2001). Позднее в течение жизни транспорт Na^+ предотвращает чрезмерное накопление жидкости (легочную эдему) и играет защитную роль, создавая оптимальные условия для мукоцилиарного транспорта (Mall et al., 2004) и функционирования эндогенных антимикробных факторов (например, дефенсинов) (Smith et al., 1996; Goldman et al., 1997; Zabner et al., 1998). Нарушение регуляции транспорта Na^+ в легких приводит к различным патологическим состояниям, таким как цистозифроз.

В настоящее время общепринятой является двухмембранная модель активного транспорта Na^+ эпителиальными клетками, предложенная Кефед-Джонсеном и Уссингом (Koefoed-Johnsen, Ussing, 1958) и в дальнейшем модифицированная Уссингом и Виндхагером (Ussing, Windhager, 1964). Схема двухмембранной модели транспорта Na^+ представлена на рис. 1. В этой модели постулирован основополагающий принцип организации транспортирующих эпителиев, согласно которому пространственно разделены клеточные мембраны, определяющие пассивную проницаемость для входа Na^+ в клетку, и мембраны, в которых располагаются натриевые насосы, создающие градиент электрохимического потенциала и обеспечивающие активный транспорт Na^+ через эпителий. Согласно современным представлениям, Na^+ пассивно входит в клетку по каналам, расположенным в наружной (апикальной, мукозной или люминальной) мембране, и удаляется из клетки при помощи Na^+/K^+ -АТФазы, локализованной во внутренней (базолатеральной или серозной) мембране эпителиальных клеток. Калий активно транспортируется Na^+/K^+ -АТФазой внутрь клетки и выводится в межклеточное пространство по K^+ -селективным каналам, также расположенным в базолатеральной мембране. Такое асимметричное распределение переносчиков обеспечивает активный пере-

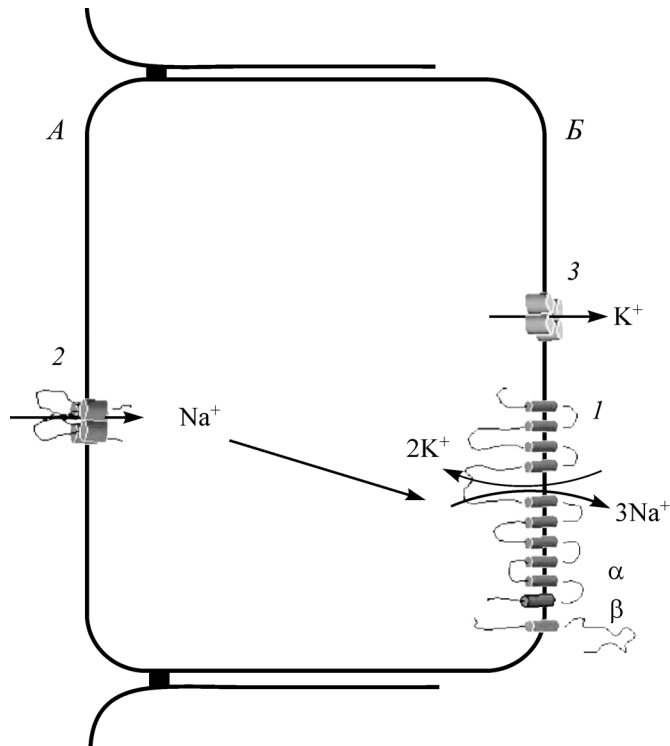


Рис. 1. Двухмембранная модель транспорта Na^+ в эпителии.

Транспорт Na^+ через эпителий является результатом координированной активности Na^+/K^+ -АТФазы (1), расположенной в базолатеральной мембране (Б), и Na^+ -каналов (2), локализованных в апикальной мембране (А) эпителиальных клеток. Калий, поступающий в клетку благодаря активности Na^+/K^+ -АТФазы, удаляется из клетки по K^+ -селективным каналам (3) в базолатеральной мембране. α , β — субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы.

нос Na^+ через эпителий и генерирует трансэпителиальный потенциал, который может быть использован для реабсорбции противоположно заряженных ионов, секреции катионов и транспорта воды. K^+ -каналы, расположенные в базолатеральной мембране эпителиальных клеток, относятся преимущественно к семейству K^+ -каналов входящего выпрямления (K_{ir}), активность которых зависит от внутриклеточной концентрации АТФ (Nagel, 1985; Urbach et al., 1994, 1996). Проводимость K_{ir} в физиологических условиях составляет 15 пСм (Urbach et al., 1994). Активность этих каналов стимулируется альдостероном и ингибируется Ba^{2+} , H^+ , хинидином и толбутамидом (Urbach et al., 1994, 1996).

Апикальная электродиффузия, являющаяся лимитирующим этапом трансэпителиального транспорта Na^+ , осуществляется через ионные каналы, имеющие очень высокую селективность для ионов Na^+ и Li^+ по отношению к ионам K^+ и чувствительные к амилориду и его производным. По структурно-функциональной организации и биофизическим свойствам Na^+ -каналы в эпителиальных тканях отличаются от потенциалзависимых Na^+ -каналов в возбудимых клетках и объединяются в особый тип Na^+ -проводящих каналов (ЕНаС). Несмотря на то что активность Na^+/K^+ -АТФазы обеспечивает энергию для транспорта Na^+ , регуляция входа Na^+ различными гормонами и фармакологическими агентами осуществляется преимущественно на уровне ЕНаС.

В последние годы достигнут существенный прогресс в исследовании структуры и топологии в мембране ЕНаС (Canessa et al., 1994a, 1994b) и Na^+/K^+ -АТФаз (For-

bush et al., 1978; Ewart, Klip, 1995), тогда как система гормональной и внутриклеточной регуляции этих ведущих компонентов системы транспорта Na^+ в эпителиальных клетках по-прежнему остается малоизученной. Известно, что активность ЕНаС и Na^+/K^+ -АТФаз в эпителиальных клетках модулируется вторичными посредниками и ключевыми молекулами различных путей передачи сигнала в клетке: арахидоновой кислотой и продуктами ее окисления (Els, Helman, 1998; Mies et al., 2004), внутриклеточным Ca^{2+} (Palmer, Frindt, 1987), циклическим аденозинмонофосфатом (Brodin et al., 1996) и протеинкиназой А (Els, Helman, 1991), протеинкиназой С (Linc, Eaton, 1989; Крутецкая и др., 2003в), G-белками (Cantiello et al., 1990) и тирозинкиназами (Rodriguez-Commes et al., 1994; Крутецкая, Лебедев, 1998). Результаты многих экспериментов свидетельствуют о важной роли элементов цитоскелета в регуляции транспорта Na^+ в различных реабсорбирующих эпителиях (Cantiello et al., 1991, 1993; Els, Chou, 1993; Cantiello, 1995; Berdiev et al., 1996; Rehn et al., 1998).

Несмотря на интенсивные исследования в этой области, молекулярные механизмы регуляции транспорта Na^+ в эпителиальных клетках в настоящее время еще далеки от полного понимания. В связи с этим в настоящей работе обобщаются самые современные данные о структурно-функциональной организации ЕНаС и о роли ключевых сигнальных молекул и элементов цитоскелета в регуляции ЕНаС. Особое внимание уделено литературным и собственным экспериментальным данным о механизмах регуляции ЕНаС в эпителиальных клетках почки и кожи лягушки.

Во втором сообщении будут рассмотрены структура, функции и механизмы регуляции другого важнейшего компонента системы транспорта Na^+ в эпителиальных клетках — Na^+/K^+ -АТФаз, выполняющих не только транспортную, но еще и сигнальную функцию в клетках различных типов.

Структурно-функциональная организация каналов суперсемейства Deg/ЕНаС

Суперсемейство Deg/ЕНаС (дегенерины/эпителиальные Na^+ -каналы) объединяет особый тип Na^+ -проводящих каналов, блокируемых диуретиком амилоридом.

Deg/ЕНаС универсальны для всех многоклеточных организмов; они экспрессируются в различных возбудимых и невозбудимых тканях и участвуют в таких разнообразных процессах, как болевая чувствительность, механочувствительность и направленный перенос Na^+ (Benos et al., 1997; Benos, Stanton, 1999; Mano, Driscoll, 1999; Kellenberger, Schild, 2002). Несмотря на то что представители суперсемейства Deg/ЕНаС функционально гетерогенны, они обладают сходными биофизическими свойствами и структурной организацией. В настоящее время описано свыше 30 представителей суперсемейства Deg/ЕНаС, в котором можно выделить 5 основных семейств.

1. Дегенерины (degenerins); кодируются генами, отвечающими за механочувствительность и дегенерацию клеток (генами *mes* и *deg* соответственно). Наиболее вероятно, что белки, кодируемые *mes*, такие как *Mes-4*, *Mes-10*, *Mes-6* и *Mes-2*, формируют (в комплексе с некоторыми дополнительными белками) ионный канал, пре-

образующий механический стимул в электрический (Huang, Chalfle, 1994).

2. Фенилаланин-метионин-аргинин-фенилаланинактивируемые Na^+ -каналы (FaNaCn); клонированные из нейронов улитки *Helix aspersa* (Benos et al., 1997; Benos, Stanton, 1999).

3. Натриевые каналы в клетках мозга (BNaCs, brain sodium channels). Известны три представителя семейства: BNaC1, BNaC2 и DRASIC (dorsal root acid-sensing ion channel), которые экспрессируются только в нейронах млекопитающих (Price et al., 1996). На основании недавно обнаруженного свойства Na^+ -каналов клеток мозга активироваться при повышении внеклеточной концентрации H^+ данный тип каналов часто обозначают как ASICs (acid-sensing ion channels, т. е. кислотно-чувствительные ионные каналы) (Kellenberger, Schild, 2002).

4. РПК/РПК-каналы (pickpocket/ripped pocket). Первые были описаны в клетках плодовой мушки дрозофилы (Adams et al., 1998). Каналы РПК-типа экспрессируются только в клетках яичников и семенников и важны для регуляции клеточного объема в течение гаметогенеза и ранних этапов развития личинки дрозофилы. Ионные каналы РПК-типа обнаружены в клетках нервной системы на поздних стадиях эмбрионального развития личинки дрозофилы и принимают участие в осуществлении процессов осязания и проприорецепции (Adams et al., 1998; Benos, Stanton, 1999; Kellenberger, Schild, 2002).

5. ENaC играют ключевую роль в транспорте Na^+ в дистальной части почечного канальца и других реабсорбирующих эпителиях, а также в протоках некоторых экзокринных желез. Являясь составной частью апикальной мембраны, ENaC обуславливают первый этап трансэпителиального транспорта Na^+ , т. е. вход Na^+ в клетку (Canessa et al., 1994a; Benos et al., 1997; Garty, Palmer, 1997; Schild et al., 1997). ENaC выделяются среди других представителей суперсемейства Deg/ENaC наиболее высокой селективностью для ионов Na^+ и Li^+ по отношению к ионам K^+ , а также очень высокой чувствительностью к амилориду (Kellenberger, Schild, 2002).

Функциональная организация ENaC и их топология в мембране. Ионный канал типа ENaC образован тремя гомологичными субъединицами — α -, β и γ , примерно на 35 % совпадающими между собой по составу аминокислот (Canessa et al., 1994b). Субъединицы ENaC содержат от 632 до 698 аминокислотных остатков, мол. масса субъединиц составляет примерно 90 кДа (Benos et al., 1997; Benos, Stanton, 1999).

Недавно были клонированы еще две субъединицы — δ и ϵ , которые по аминокислотному составу ближе к α -, чем к β - или γ -субъединице ENaC (Benos et al., 1997; Benos, Stanton, 1999; Kellenberger, Schild, 2002). ENaC, в состав которого входит δ -субъединица, широко представлен в мозге человека (Kellenberger, Schild, 2002), он также обнаружен в клетках сердца, почки и поджелудочной железы человека (Waldmann et al., 1995; Yamamura et al., 2004).

Все представители суперсемейства Deg/ENaC характеризуются сходным строением субъединиц и топологией в плазматической мембране. Число субъединиц, формирующих функционально активный канал, у разных семейств Deg/ENaC различно. Организация и топология в мембране субъединицы ионного канала Deg/ENaC показаны на рис. 2, а. Каждая субъединица Deg/ENaC образована четырьмя различающимися по структуре и функциям доменами: цитоплазматическим N-кон-

цом, двумя короткими гидрофобными трансмембранными сегментами (M1 и M2), крупной экстраклеточной петлей и цитоплазматическим C-концом (Canessa et al., 1994b; Schild et al., 1997; Benos, Stanton, 1999; Kellenberger, Schild, 2002) (рис. 2, а). Наличие крупного экстраклеточного фрагмента (50 кДа), на который приходится до 70 % аминокислотного состава субъединицы, является характерным структурным признаком ионных каналов суперсемейства Deg/ENaC (Canessa et al., 1994a; Benos et al., 1997; Benos, Stanton, 1999; Kellenberger, Schild, 2002).

В составе субъединиц Deg/ENaC обнаружены участки, консервативные по аминокислотному составу (рис. 2, а). Одни фрагменты являются единичными для всех представителей этого суперсемейства, другие консервативны только внутри представителей отдельных семейств. Подобные фрагменты являются важными структурными элементами, необходимыми для нормального функционирования канала.

Некоторые из них участвуют в формировании проводящего пути канала (сегменты пре-M1 и M2) (Kellenberger, Schild, 2002), другие определяют воротные функции канала (сегменты HG и DEG) (Kellenberger et al., 2002). Богатые цистеином фрагменты CRD II и CRD III, локализованные в экстраклеточной петле, вовлечены в поддержание третичной структуры этого крупного домена (Firsov et al., 1999).

Для представителей семейства ENaC характерно наличие высококонсервативной богатой пролином последовательности аминокислот (PPPXY) или PY-сегмента в составе цитоплазматического C-терминального домена каждой из трех (α , β и γ) субъединиц ENaC (Benos, Stanton, 1999; Kellenberger, Schild, 2002). PY-сегмент отвечает за связывание канала с убиквитиновой лигазой Nedd 4 (neuronal precursor cell developmentally downregulated protein 4). Делеция этого фрагмента приводит к ингибированию деградации канала и увеличению макроскопического Na^+ -тока (Price, Welsh, 1999; Snyder, 2005).

Стехиометрия субъединиц и модель поры ENaC. Наиболее вероятно, что нативный ENaC представляет собой гетеротетрамер, образованный двумя α -, одной β - и одной γ -субъединицами, располагающимися вокруг поры канала, в котором две α -субъединицы располагаются напротив друг друга (Canessa et al., 1994a; Firsov et al., 1998; Eskandari et al., 1999). Модель тетрамерной организации ENaC представлена на рис. 2, б. Описана также нонамерная организация ENaC со стехиометрией субъединиц $3\alpha : 3\beta : 3\gamma$ (Kosari et al., 1998; Snyder et al., 1998; Staruschenko et al., 2004a, 2005). Однако в настоящее время не существует модели, описывающей строение поры нонамерного ENaC.

Согласно тетрамерной модели организации ENaC, все три субъединицы (α , β и γ) участвуют в формировании поры канала и определяют все важнейшие его характеристики — проводимость, селективность, воротные функции и взаимодействие с блокаторами. Модель поры тетрамерного канала показана на рис. 2, в. Наружное устье поры образовано сегментами пре-M2 всех субъединиц ENaC. В наиболее широкой части его диаметр равен приблизительно 5 Å (Kellenberger, Schild, 2002). По мере сужения устья поры последовательно располагаются DEG-сайт (α Ser576, β Ser518 и γ Ser530), необходимый для осуществления воротных функций канала, и сайт связывания (α Ser583, β Gly525, γ Gly537) блокатора канала — амилорида.

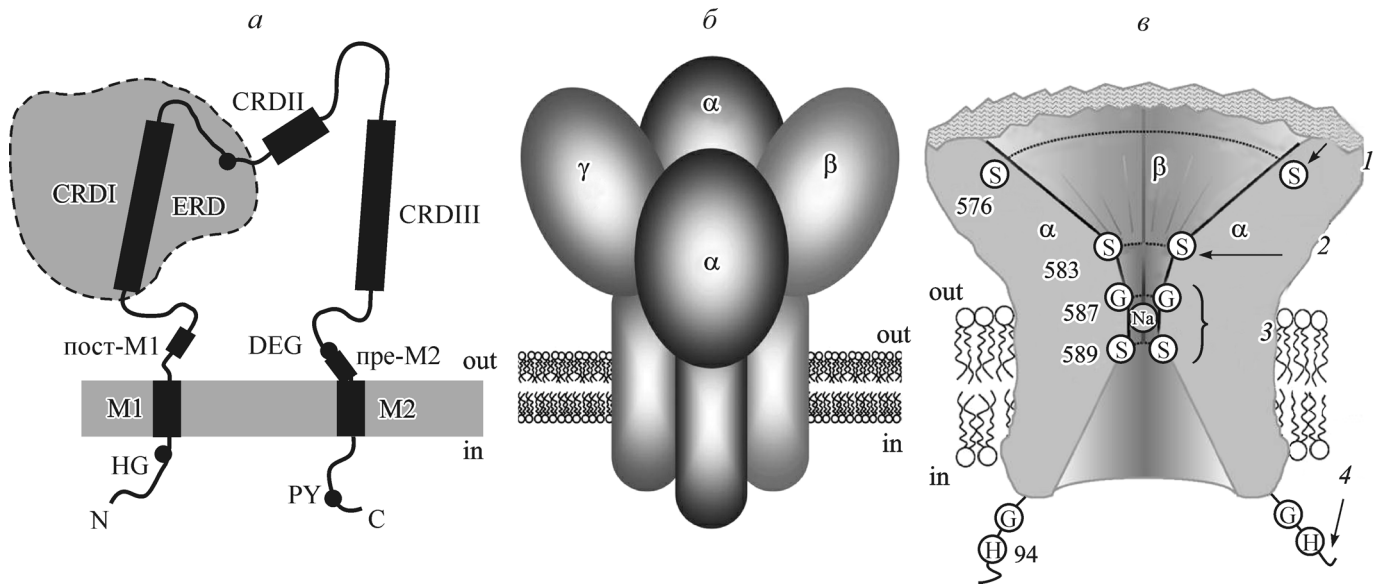


Рис. 2. Структура и топология в мембране Deg/ENaC.

a — топология в мембране субъединиц Deg/ENaC. M1, M2 — трансмембранные сегменты; HG — консервативный фрагмент His-Gly в составе консервативного цитоплазматического N-терминального домена; пост-M1 — консервативный участок аминокислот, следующий непосредственно за первым трансмембранным сегментом M1; CRDI—CRDIII — богатые цистеином фрагменты, ERD — регуляторный фрагмент в составе экстраклеточного домена; пре-M2 — участок гидрофобных аминокислот, располагающийся перед вторым трансмембранным сегментом M2; PY — фрагмент, высококонсервативный для представителей семейства ENaC, богат пролином (PPxY); DEG — экстраклеточный воротный домен. Для представителей семейства дегенерины консервативными являются фрагменты ERD и CRDI. *б* — модель тетрамерной организации ENaC. α , β и γ — субъединицы ENaC; *в* — гипотетическая модель поры ENaC. Показаны пре-M2 сегменты двух α -субъединиц (правой и левой) и β -субъединица на заднем плане. Четвертая — γ -субъединица, расположенная на стороне зрителя, не показана. Наружное устье поры формируют сегменты пре-M2 всех субъединиц. 1 — экстраклеточный воротный домен (DEG-сайт) (S576); 2 — участок связывания амилорида (S583); 3 — селективный фильтр канала (в котором показан ион Na^+); 4 — внутриклеточный воротный домен (HG); Буквами S, G и H обозначены остатки серина, глицина и гистидина соответственно. Номера аминокислотных остатков указаны для α -субъединиц.

Внутреннюю часть поры и селективный фильтр канала формируют сегменты пре-M2 и M2. Селективный фильтр канала образован в верхней части остатками глицина α - и β -субъединиц ($\alpha\text{Gly}587$ (рис. 2, *в*) и $\beta\text{Gly}529$) и остатком серина γ -субъединицы ENaC ($\gamma\text{Ser}541$). Нижняя часть селективного фильтра образована кольцом из остатков серина ($\alpha\text{Ser}589$; см. рис. 2, *в*) и гомологичных ему остатков в β - и γ -субъединицах ENaC. Диаметр селективного фильтра ENaC равен 1.9—2.7 Å (Kellenberger et al., 2001, 2002).

В настоящее время интенсивно изучаются вторичная структура участков белковой молекулы, принимающих участие в формировании поры канала, и третичная архитектура субъединиц ENaC. Предполагается, что по принципу организации поры ENaC близки к бактериальным потенциалзависимым калиевым KcsA-каналам, третичное строение белковой молекулы которых достаточно подробно изучено. Как и ENaC, KcsA является тетрамерным каналом, в состав субъединиц которого входят два трансмембранных домена. В настоящее время существуют две основные модели организации поры ENaC (Kellenberger et al., 1999; Snyder et al., 1999; Sheng et al., 2000).

Согласно модели, предложенной Шенгом и соавторами (Sheng et al., 2000), сегменты пре-M2, образующие наружное устье поры, и трансмембранные сегменты M2, образующие цитоплазматическую часть поры, уложены в форме α -спирали. Таким образом, эта модель предполагает практически полную аналогию структур поры KcsA и ENaC.

Альтернативная модель, предложенная Келленбергером и Снайдером (Kellenberger et al., 1999; Snyder et al.,

1999), предполагает лишь частичное сходство в строении поры указанных типов тетрамерных ионных каналов. Согласно этой модели, наружное устье поры и селективный фильтр ENaC образованы остатками аминокислот в виде β -структуры (аминокислотные остатки 583—589), в то время как внутренняя часть поры образована α -спиральными трансмембранными M2-сегментами.

Биофизические характеристики ENaC. В отличие от потенциалзависимых Na^+ -каналов активность ENaC не зависит от изменения мембранного потенциала (Benos et al., 1995; Garty, Palmer, 1997).

ENaC отличаются высокой селективностью для ионов Na^+ по отношению к ионам K^+ (Benos et al., 1995; Garty, Palmer, 1997; Snyder, 2002). ENaC проницаемы для моновалентных катионов, таких как Na^+ , Li^+ и H^+ . Проницаемость ENaC-каналов для ионов Li^+ немного выше, чем для Na^+ . Крупные моно- и двухвалентные катионы в норме не проходят через пору ENaC (Garty, Palmer, 1997; Kellenberger, Schild, 2002; Snyder, 2002).

Диаметр селективного фильтра ENaC меньше, чем у потенциалзависимых Na^+ - и K^+ -каналов, и составляет 1.9—2.7 Å (Kellenberger et al., 2001; Kellenberger, Schild, 2002). Селективность ENaC и размер селективного фильтра зависят от аминокислотных остатков в положении $\alpha\text{Ser}589$, атомы кислорода карбонильных групп которых выстилают пору в области селективного фильтра. Боковые цепи ($-\text{CH}_2\text{OH}$) остатков $\alpha\text{Ser}589$ ориентированы наружу от полости поры. Замена $\alpha\text{Ser}589$ на аминокислотные остатки больших размеров приводит к увеличению диаметра поры и изменению ряда селективности канала (Kellenberger, Schild, 2002).

Проводимость ENaC для ионов Na^+ при комнатной температуре и концентрации Na^+ в наружном растворе 100—150 mM составляет от 4 до 30 пСм в зависимости от типа ENaC (Garty, Palmer, 1997; Kellenberger, Schild, 2002; Snyder, 2002).

Блокаторами ENaC являются пиразинкарбоксамид амилорид и его аналоги (бензамил и фенамил) и триамтерен, являющиеся эффективными диуретиками (Bentley, 1968; Venos et al., 1995). Структура некоторых аналогов амилорида, блокирующих ENaC, представлена на рис. 3. Установлено, что в связывании с рецептором в наружном устье канала участвуют положительно заряженная гуанидиновая группа и пиразиновое кольцо, входящие в состав молекул блокаторов (Bentley, 1968; Kleyman, Cragoe, 1988; Garty, Palmer, 1997; Kellenberger, Schild, 2002).

Амилорид (в субмикромольной концентрации) в виде катиона блокирует канал со стороны наружного устья. Блокирующее действие амилорида зависит от величины мембранного потенциала и увеличивается при гиперполяризации мембраны (Garty, Palmer, 1997). Помимо амилорида способностью блокировать ENaC обладают крупные органические и неорганические катионы при добавлении их со стороны апикальной поверхности клетки (Kellenberger, Schild, 2002).

Основной участок связывания амилорида расположен в наружном устье поры ENaC — аминокислотные остатки αSer583 (см. рис. 2, в), βGly525 и γGly537 . Замена остатков глицина в β - и γ -субъединицах ENaC снижает чувствительность канала к амилориду более чем в 1000 раз (Schild et al., 1997). При замене гомологичных им остатков серина в α -субъединицах чувствительность канала к амилориду снижается примерно в 20 раз (Kellenberger, Schild, 2002).

С применением поли- и моноклональных антител против амилорида в CRD II-экстраклеточном домене α -субъединицы ENaC (см. рис. 2, а, в) обнаружена последовательность из 6 аминокислотных остатков (Trp-Tyr-Arg-Phe-His-Tyr), точечные мутации в которой приводят к снижению чувствительности канала к амилориду (Garty, Palmer, 1997; Kellenberger, Schild, 2002). Однако в настоящее время неизвестно, какую роль выполняет данный фрагмент в процессе блокирования канала амилоридом.

В последнее время обнаружены агенты, специфически активирующие или ингибирующие активность δ -субъединицы ENaC. Так, показано, что капсазепин (Yamamura et al., 2004) и ицилин (тетрагидропиримидин-2-один) (Yamamura et al., 2005b) значительно усиливают активность ENaC человека, образованного δ -, β - и γ -субъединицами и экспрессированного в ооцитах *Xenopus laevis*. Специфическим ингибитором δ -субъединицы ENaC человека является краситель синий Эванса (Evans blue), применяемый в качестве диагностического зонда для измерения объема крови и проницаемости сосудов (Yamamura et al., 2005a).

Кинетические характеристики токов через ENaC зависят от типа ENaC (Palmer, Frindt, 1996). Механизмы, лежащие в основе процессов активации и инактивации ENaC, в настоящее время неизвестны. В составе ENaC выделяют по крайней мере два регуляторных домена, принимающих участие в осуществлении воротных функций (см. рис. 2): цитоплазматический N-терминальный домен His94-Gly, необходимый для открывания канала, и экстраклеточный DEG-сайт (αSer576 , βSer518 ,

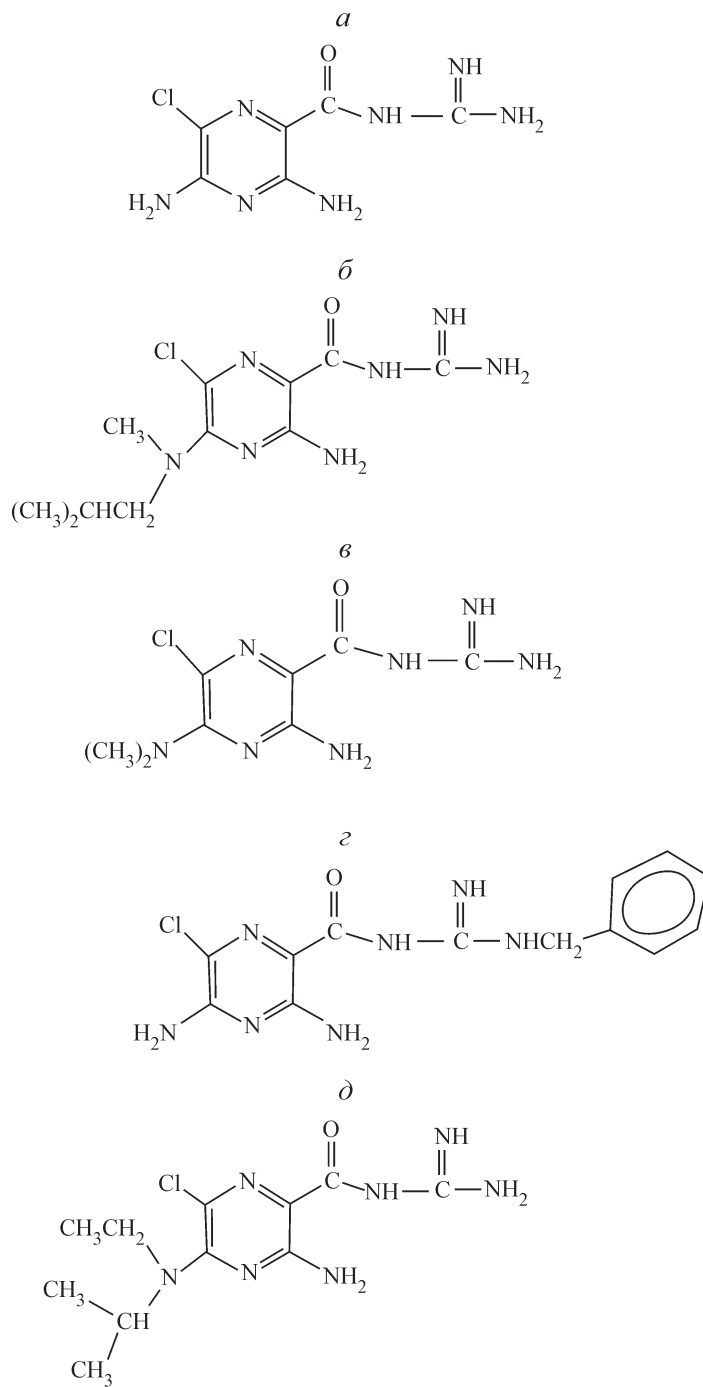


Рис. 3. Структура блокаторов ENaC.

a — амилорид (3,5-диамино-N-(аминоиминетил)-6-хлоропиразин-карбоксамид); б — метил изобутил амилорид; в — диметил амилорид; г — бензамил; д — 5-(N-этил-N-изопропил)-амилорид.

γSer530), участвующий в закрывании канала (Kellenberger et al., 2002; Kellenberger, Schild, 2002; Snyder, 2002).

В настоящее время выделено несколько типов ENaC, различающихся по селективности, проводимости и чувствительности к амилориду. Натриевые каналы, опосредующие реабсорбцию Na^+ в дистальных сегментах нефрона млекопитающих или всасывание Na^+ в эпителии кожи и мочевого пузыря амфибий, относятся к типу высокоселективных, или H-типу ENaC (Garty, Palmer, 1997; Kellenberger, Schild, 2002).

Отличительными свойствами Н-типа ENaC являются очень высокая чувствительность к амилориду (константа ингибирования $K_i < 1$ мкМ) и самая высокая среди ENaC селективность для ионов Na^+ по отношению к ионам K^+ ($P_{\text{Na}^+}/P_{\text{K}^+} > 500$) (Benos et al., 1995; Garty, Palmer, 1997; Kellenberger, Schild, 2002). Проницаемость ENaC каналов Н-типа для ионов Li^+ примерно в 1.5 раза выше, чем для ионов Na^+ (Garty, Palmer, 1997).

Другой характерной особенностью высокоселективных Na^+ -каналов является самая медленная среди всех типов ENaC кинетика (Garty, Palmer, 1997). В среднем длительность открытого и закрытого состояний канала составляет (при комнатной температуре) 0.5—5.0 с (Garty, Palmer, 1997; Kellenberger, Schild, 2002).

Проводимость одиночного канала для входящего тока составляет 4—5 пСм для Na^+ и 8—10 пСм для Li^+ (при комнатной температуре и концентрации Na^+ в наружном растворе 100—150 мМ) и незначительно увеличивается при повышении температуры (Benos et al., 1995; Garty, Palmer, 1997; Kellenberger, Schild, 2002).

В последние десятилетия молекулярные механизмы, лежащие в основе регуляции активности амилорид-чувствительных ENaC, являются предметом интенсивных исследований. В настоящее время показано, что в регуляции активности ENaC участвуют различные пути передачи сигнала в клетке.

Роль аденилатциклазного пути передачи сигнала в регуляции активности ENaC

В различных сегментах почки позвоночных и эпителии кожи и мочевого пузыря амфибий рецепторы некоторых пептидных гормонов (вазопрессина и паратиреоидного гормона) и катехоламинов (дофамина и адреналина) связаны с большими G_s -белками. Связывание гормона с рецептором приводит к активации аденилатциклазы и увеличению внутриклеточной концентрации циклического аденозинмонофосфата (цАМФ). Другие агонисты, такие как ангиотензин II или норадреналин, связываясь с рецепторами, активируют G_i -белки, что приводит к ингибированию аденилатциклазы.

Показано, что увеличение внутриклеточной концентрации цАМФ стимулирует трансэпителиальный транспорт Na^+ во многих реабсорбирующих эпителиях путем увеличения проницаемости апикальной мембраны для Na^+ (Els, Mahlangu, 1987). Установлено, что стимулирующее влияние цАМФ на ENaC опосредуется активацией цАМФ-зависимой протеинкиназы А.

В настоящее время предполагают две основные схемы увеличения активности ENaC, обусловленного протеинкиназой А: прямое фосфорилирование белков ENaC, приводящее к увеличению вероятности открытого состояния или проводимости одиночных каналов, и встраивание в апикальную мембрану новых каналов, опосредованное фосфорилированием протеинкиназой А и других белков (Garty, Palmer, 1997).

Основные доказательства в поддержку гипотезы о прямом фосфорилировании протеинкиназой А были получены при изучении характеристик очищенных белковых комплексов ENaC (300 кДа), реконструированных в липидный бислой. Взаимодействие встроенных каналов с каталитической субъединицей протеинкиназы А в присутствии АТФ вызывало значительное увеличение вероятности открытого состояния канала и предотвращалось

воздействием щелочной фосфатазы или коклюшного токсина (Oh et al., 1993; Garty, Palmer, 1997). Однако прямое фосфорилирование протеинкиназой А белков ENaC не показано для большинства нативных эпителиев. В то же время результаты многих экспериментов свидетельствуют о том, что в эпителии кожи лягушек (Els, Helman, 1991) и клетках почки амфибий (Marunaka, Eaton, 1991) опосредованная цАМФ стимуляция ENaC связана с увеличением числа активных каналов в апикальной мембране.

Регуляция активности ENaC вазопрессином

В большинстве реабсорбирующих эпителиев, в том числе в эпителии кожи (Nagel, 1978; Els, Helman, 1981) и мочевого пузыря лягушки (Orloff, Handler, 1962), а также в клетках почки млекопитающих (Rief et al., 1986), вазопрессин (антидиуретический гормон) или его аналоги (окситоцин и вазотоцин) стимулируют трансэпителиальный транспорт Na^+ посредством увеличения внутриклеточной концентрации цАМФ и активации протеинкиназы А. Стимулирующее влияние вазопрессина на транспорт Na^+ инициируется связыванием гормона с V_2 -рецептором, локализованным в базолатеральной мембране, что приводит к активации аденилатциклазы (рис. 4).

Различают быстрое влияние вазопрессина на транспорт Na^+ (в течение нескольких минут) благодаря активации ENaC и длительное (в течение нескольких часов) в результате изменения уровня транскрипции некоторых генов (Robert-Nicoud et al., 2001).

Известно, что в коже лягушки и клетках почки амфибий (клетки А6) быстрое действие вазопрессина на ENaC, так же как это показано для форсколина, связано с увеличением плотности открытых ENaC (Els, Helman, 1991; Chou, Els, 1995). Однако механизмы, посредством которых осуществляется индуцируемое вазопрессином увеличение числа ENaC в апикальной мембране клеток эпителия, в настоящее время неизвестны. В то же время показано, что при стимуляции эпителиальных клеток вазопрессином ни цАМФ, ни протеинкиназа А непосредственно не взаимодействуют с белками ENaC (Els, Helman, 1991). Наиболее вероятно, что вазопрессин индуцирует слияние с апикальной мембраной везикул, содержащих преэкспрессированные ENaC (Els, Helman, 1991), или активирует уже существующие в мембране, но находящиеся в неактивном состоянии каналы (Chou, Els, 1995, 1997).

Гипотеза индуцированного вазопрессином встраивания в мембрану везикул, содержащих Na^+ -каналы, подтверждается многими экспериментальными данными. Так, с применением метода локальной фиксации потенциала на клеточной линии А6 почки лягушки было показано, что вазопрессин вызывает двух- и трехкратное увеличение числа каналов в патче, не изменяя при этом значений вероятности открытого состояния канала (Marunaka, Eaton, 1991). Кроме того, брэфельдин А, метаболит грибов, нарушающий внутриклеточный транспорт, блокирует индуцированное вазопрессином увеличение активности ENaC и Na^+ -проницаемости апикальной мембраны в эпителиальных клетках А6 (Garty, Palmer, 1997; Butterworth et al., 2004).

В качестве одного из наиболее вероятных субстратов, опосредующих влияние вазопрессина на каналы, многие авторы рассматривают белки цитоскелета. Хоро-

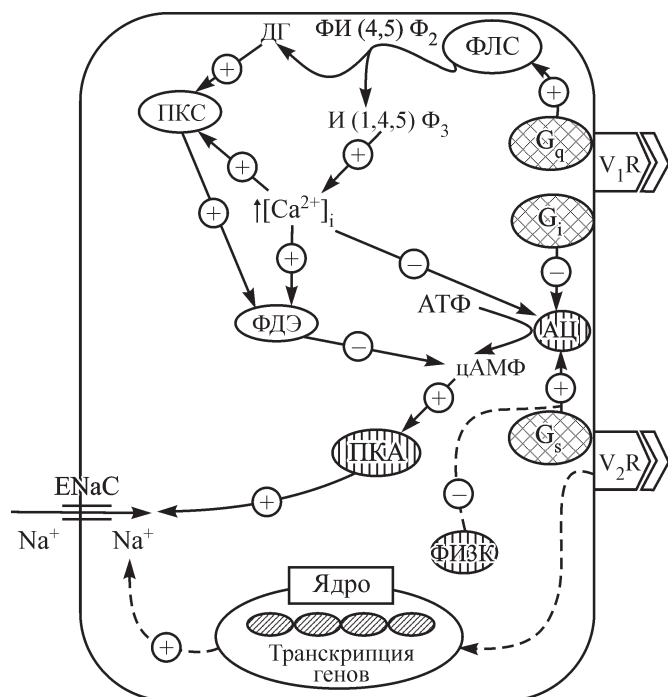


Рис. 4. Аденилатцикласный путь передачи сигнала и регуляция вазопрессинном активности ENaC в эпителии кожи и клетках почки амфибий.

ENaC — амилорид-чувствительные Na^+ -каналы; V_2R и V_1R — рецепторы вазопрессина, связанные соответственно с гетеротримерными G_s - и G_q -белками; G_s стимулирует, а G_i ингибирует активность аденилатциклазы (АЦ); G_q стимулирует активность фосфолипазы С (ФЛС); АТФ — аденозинтрифосфат; цАМФ — циклический аденозинмонофосфат; PKA — цАМФ-зависимая протеинкиназа А; ДГ — диацилглицерин; И(1,4,5)Ф₃-инозитол-1,4,5-трифосфат; ФЛС — фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат; ПКС — протеинкиназа С; Ca^{2+} — увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ; ФДЭ — фосфодиэстераза; ФЛЗК — фосфатидилинозитол-3-киназа. Знаки «+» и «-» показывают активацию и инактивацию соответственно.

шо известно, что в мочевом пузыре амфибий вазопрессин стимулирует встраивание в мембрану аквапоринов путем опосредованного протеинкиназой А фосфорилирования белков цитоскелета, вызывающего деполимеризацию структур цитоскелета, которая в свою очередь облегчает встраивание каналов в мембрану (Hauss, Lindberg, 1991; Gao et al., 1992). В пользу предположения о том, что влияние вазопрессина на ENaC также опосредуется индуцируемыми гормоном изменениями структуры цитоскелета, свидетельствуют результаты многих экспериментов. Так, в клетках А6 и клетках кортикальных собирательных протоков почки (клетках CCD) мыши деполимеризация микротрубочек и микрофиламентов существенно снижает стимулирующее влияние вазопрессина на транспорт Na^+ (Verrey et al., 1995; Butterworth et al., 2004). Кроме того, стимулирующее влияние вазопрессина на транспорт Na^+ предотвращается ингибиторами экзоцитоза и эндоцитоза (Butterworth et al., 2004), что подтверждает предположение о том, что в этих модельных системах индуцируемое вазопрессинном увеличение проницаемости апикальной мембраны для Na^+ вызвано встраиванием новых каналов из субапикального пула (Verrey et al., 1995; Butterworth et al., 2004).

Известно, что в эпителии кожи лягушки вазопрессин вызывает деполимеризацию микрофиламентов (Chou, Els, 1995), так же как в мочевом пузыре амфибий (Gao

et al., 1992) и клетках CCD млекопитающих (Simon et al., 1993). Однако предварительная обработка кожи лягушки цитохалазином В не предотвращает стимулированного вазопрессинном увеличения плотности ENaC в мембране (Chou, Els, 1997). Таким образом, механизмы, посредством которых осуществляется индуцируемое вазопрессинном встраивание ENaC в апикальную мембрану клеток эпителия кожи лягушки, и роль цитоскелета в осуществлении этих процессов в настоящее время остаются неизвестными.

В последнее время появляются сообщения о возможной роли фосфатидилинозитолкина (ФИ-киназы) в регуляции вазопрессинном транспорта Na^+ и активности ENaC. Показано, что ингибиторы ФИ-киназы предотвращают стимулирующее действие вазопрессина на ENaC в клетках почки амфибий (Edinger et al., 1999). При этом ингибирование ФИ-киназы не предотвращает увеличения внутриклеточной концентрации цАМФ форсколином, позволяя предположить, что участок, регулируемый ФИ-киназами, располагается между белком G_s и аденилатциклазой (см. рис. 4).

Связывание вазопрессина с рецептором типа V_1 , ассоциированным с G_q -белками, активирующими фосфолипазу С, вызывает увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , стимулирует метаболизм фосфоинозитидов и активирует протеинкиназу С (Morel et al., 1992). Предполагается, что активация V_1 -рецептора является механизмом обратной связи, лимитирующим стимулирующее воздействие вазопрессина (см. рис. 4). Подобный механизм описан в клетках CCD млекопитающих, где увеличение Ca^{2+} , индуцируемое активацией рецептора типа V_1 , приводит к подавлению активности изоформы аденилатциклазы AC5, ингибируемой Ca^{2+} (Sunahara, Taussig, 2002), и подавлению транспорта Na^+ (Jaisser et al., 1989).

Роль фосфоинозитидного пути передачи сигнала в регуляции активности ENaC

Известно, что этот путь участвует в регуляции активности различных компонентов системы транспорта Na^+ в поляризованных клетках. Агонистами рецепторов, стимулирующих гетеротримерные G_q -белки и активирующих фосфолипазу С, являются многие пептидные гормоны, такие как паратиреоидный гормон, ангиотензин II, катехоламин, норадреналин и дофамин, влияние которых на активность ENaC показано как для кожи амфибий, так и для многих других реабсорбирующих эпителиев.

Гидролиз усилительным ферментом фосфолипазой С ФИ-4,5-дифосфата приводит к образованию двух различных соединений, служащих вторичными мессенджерами: водорастворимого инозитол-1,4,5-трифосфата и липидорастворимого диацилглицерина (Berridge, 1993), что обуславливает раздвоение путей внутриклеточной сигнализации при передаче сигнала с помощью гидролиза фосфоинозитидов (рис. 5).

Диффундируя в цитоплазму, гидрофильный инозитол-1,4,5-трифосфат вызывает освобождение кальция из внутриклеточных депо и увеличение внутриклеточной концентрации кальция (Ca^{2+}). В большинстве реабсорбирующих эпителиев (в том числе и в эпителии кожи лягушки) увеличение Ca^{2+} вызывает ингибирование ENaC и снижение трансэпителиального транспорта Na^+ (Wiessmann et al., 1977; Grinstein, Erlj, 1978; Erlj et al., 1986; Frindt et al., 1988; Brodin et al., 1996; Rytved et al.,

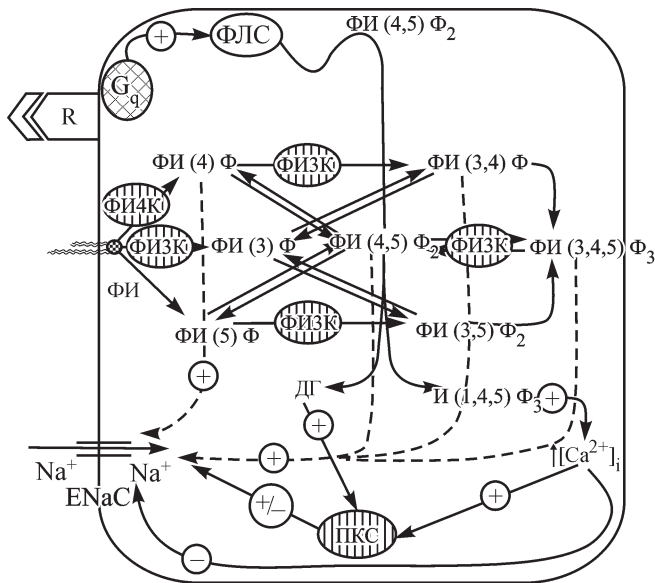


Рис. 5. Различные этапы фосфоинозитидного пути передачи сигнала в регуляции активности ENaC в эпителии кожи и клетках почки амфибий.

ENaC — амилорид-чувствительные Na^+ -каналы; ФЛС — фосфолипаза С; R — рецептор, связанный с гетеротримерным G-белком (G_q), активирующим фосфолипазу С; ДГ — диацилглицерин; ФИ — фосфатидилинозитол; И(1,4,5)Ф₃ — инозитол-1,4,5-трифосфат; ПКС — протеинкиназа С; $1[\text{Ca}^{2+}]_i$ — увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ; ФИ4К — фосфатидилинозитол-4-киназа; ФИЗК — фосфатидилинозитол-3-киназа; ФИ(3)Ф — фосфатидилинозитол-3-монофосфат; ФИ(4)Ф — фосфатидилинозитол-4-монофосфат; ФИ(5)Ф — фосфатидилинозитол-5-монофосфат; ФИ(3,4)Ф₂ — фосфатидилинозитол-3,4-дифосфат; ФИ(3,5)Ф₂ — фосфатидилинозитол-3,5-дифосфат; ФИ(4,5)Ф₂ — фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат (PIP₂); ФИ(3,4,5)Ф₃ — фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат.

1996). В эпителии кожи лягушки увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ активирует Cl^- -каналы (Brodin et al., 1996; Rytved et al., 1996) и ингибирует K^+ -каналы (Taylor, Windhager, 1979; Uhrbach et al., 1994), расположенные в базолатеральной мембране эпителиальных клеток, вызывая деполяризацию мембранного потенциала и резкое снижение электродвижущей силы транспорта Na^+ (Brodin et al., 1996). Однако наиболее вероятно, что ионы Ca^{2+} ингибируют ENaC независимо от изменения электродвижущей силы транспорта Na^+ , которое развивается параллельно и является дополнительным стимулом, обуславливающим негативное влияние увеличения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} на транспорт Na^+ (Taylor, Windhager, 1979; Brodin et al., 1996). Механизмы, обуславливающие ингибирующее влияние Ca^{2+} на ENaC в эпителии кожи лягушки и других реабсорбирующих эпителиях, неизвестны. Предполагают, что увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ является медиатором, опосредующим ингибирование ENaC по типу обратной связи: уменьшение транспорта Na^+ ослабляется при уменьшении концентрации внутриклеточного Ca^{2+} (Taylor, Windhager, 1979).

С применением метода локальной фиксации потенциала на клетках А6 показано, что ингибирующее действие Ca^{2+} на ENaC опосредуется активацией протеинкиназы С (ПКС) (Els et al., 1998). Кроме того, ингибитор ПКС сфингозин препятствует увеличению активности каналов в клетках А6 (Garty, Palmer, 1997). Однако в условиях *in vitro* прямое действие Ca^{2+} на ENaC наблюдалось для каналов, выделенных из клеток мочевого пузыря

жабы и встроенных в мембранные везикулы (Garty, Palmer, 1997).

Несмотря на то что в большинстве случаев увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ связано с ингибированием ENaC и снижением транспорта Na^+ , в серии экспериментов на клетках А6 увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ приводило к стимуляции транспорта Na^+ (Garty, Palmer, 1997). Для эпителия кожи лягушки также было показано, что увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ вызывает кратковременную стимуляцию ENaC, увеличивая вероятность открытого состояния канала (Els et al., 1998), сменяющуюся в дальнейшем ингибированием Na^+ -каналов. Кроме того, стимуляция транспорта Na^+ многими гормонами (альдостероном, вазопрессином, инсулином и паратиреоидным гормоном) связана с увеличением $[\text{Ca}^{2+}]_i$, и хелатирование внутриклеточного Ca^{2+} приводит к снижению стимулирующего действия гормонов (Garty, Palmer, 1997). Причина подобных противоречий неизвестна.

Ключевым компонентом ветви фосфоинозитидного пути передачи сигнала, контролируемой диацилглицерином, является ПКС. Природными вторичными посредниками, активирующими данный фермент, являются длинноцепочечные диацилглицерины; сходным действием на ПКС обладают промоторы опухолевого роста — форболовые эфиры (Castagna et al., 1982; Ashended et al., 1983; см. обзор: Крутецкая, Лебедев, 2000). Установлено, что дицилглицерин и форболовые эфиры связываются с одним и тем же участком в составе богатых цистеином фрагментов, располагающихся на N-конце регуляторного домена ПКС (Sharkey et al., 1984). Эти богатые цистеином участки связывания имеют очень высокую степень консервативности среди изоформ ПКС (Kazanietz et al., 1993).

ПКС является Ca^{2+} - и фосфолипидзависимой серинтреониновой киназой, активность которой модулируется связыванием с плазматической мембраной (см. обзор: Крутецкая, Лебедев, 2000). Показано, что ПКС имеет также АТФазную и фосфатазную активность (Newton, 1995).

В настоящее время известно десять изоформ ПКС (Hanks, Hunter, 1995; Nishisuka, 1995). Выделяют четыре классические изоформы ПКС (α , β I, β II, β III и γ), на N-конце регуляторного домена которых обнаружены два богатых цистеином фрагмента, формирующих структуру, называемую «цинковые пальцы». Благодаря наличию этих фрагментов классические изоформы ПКС имеют высокую чувствительность к диацилглицеринам, форболовым эфирам и фосфатидилсерину, которые являются активаторами этих изоформ ПКС. Классические изоформы ПКС содержат участок связывания с ионами Ca^{2+} (C2), которые необходимы для активации фермента. Четыре новые изоформы ПКС (δ , ϵ , η и θ) активируются диацилглицеринами, форболовыми эфирами и фосфатидилсеринем, но являются Ca^{2+} -независимыми протеинкиназами. Хотя в составе этих изоформ также идентифицирован фрагмент, сходный с участком C2, обнаруженным в составе классических изоформ ПКС, этот фрагмент не способен связывать ионы Ca^{2+} (Sossin, Schwartz, 1993). Три атипичные изоформы ПКС (ξ , λ и ι) имеют в составе регуляторного домена богатый цистеином фрагмент, нечувствительный к диацилглицеринам или форболовым эфирам, но активируемый фосфатидилсеринем. Кроме того, атипичные ПКС нечувствительны к ионам Ca^{2+} . Все три типа изоформ ПКС проявляют разную субстратную специфичность, имеют различные кинетические характеристики и чувствительность к активаторам и протеазам (Hanks, Hunter, 1995; Nishisuka, 1995; см. обзор: Крутецкая, Лебедев, 2000).

ПКС является регулятором самых разных клеточных функций. Есть данные о способности ПКС регулировать транспорт Na^+ в различных типах эпителиальных тканей путем изменения активности ENaC. ПКС вовлечена в регуляцию активности ENaC различными гормонами, такими как вазопрессин (Civan et al., 1985; Mauro et al., 1987; Satoh, Endou, 1990), инсулин (Civan et al., 1988, 1989) и альдостерон (Stockand et al., 2000). При этом показано, что в различных эпителиальных тканях активация ПКС по-разному влияет на активность ENaC. Так, в коже лягушки активация ПКС форболовыми эфирами приводит к стимуляции активности ENaC и увеличению трансэпителиального транспорта Na^+ (Yorio et al., 1983; Civan et al., 1985, 1987, 1989; Mauro et al., 1987; Andersen et al., 1990; Chalfant et al., 1996; Els et al., 1998; Пашина и др., 2002; Krutetskaya et al., 2002; Крутецкая и др., 2003в), тогда как в эпителии мочевого пузыря и клетках почки амфибий и млекопитающих активация ПКС вызывает ингибирование ENaC и снижение трансэпителиального транспорта Na^+ (Yanase, Handler, 1986; Ling, Eaton, 1989; Satoh, Endou, 1990; Rouch et al., 1993; Silver et al., 1993; Rokaw et al., 1996; Els et al., 1998). Наиболее вероятно, что стимулирующее или ингибирующее влияние ПКС на транспорт Na^+ и функциональные характеристики Na^+ -каналов связано с существованием разных изоформ ПКС в различных эпителиальных системах. Это согласуется с данными о том, что в мочевом пузыре жабы и клетках линии А6 (для которых показано ингибирование транспорта Na^+ при активации ПКС форболовыми эфирами) присутствует преимущественно Ca^{2+} -зависимая α -изоформа этого фермента (Schlondorff, Levine, 1985; Awayda et al., 2002), в то время как в коже лягушки (для которой показано стимулирующее влияние форболовых эфиров на транспорт Na^+) идентифицированы Ca^{2+} -независимые изоформы ПКС (Civan et al., 1991).

В пользу гипотезы об участии в регуляции активности ENaC и транспорта Na^+ разных изоформ ПКС свидетельствуют также данные о том, что ингибиторы ПКС, взаимодействующие с различными участками фермента, различаются по своему влиянию на транспорт Na^+ в различных типах эпителиальных клеток. Так, на клетках А6 показано, что ингибиторы ПКС, взаимодействующие с участком связывания ионов Ca^{2+} (участок С2), вызывают временное увеличение активности ENaC и транспорта Na^+ (Awayda et al., 2002), тогда как фармакологические агенты, выступающие в качестве псевдосубстрата для ПКС, вызывают снижение транспорта Na^+ в клетках А6 (Rokaw et al., 1996). В то же время в коже лягушки *Rana temporaria* нами не обнаружено различий во влиянии на базальный уровень транспорта Na^+ различных ингибиторов ПКС (соединения Н-7 и хелеритрина) (Пашина и др., 2002; Krutetskaya et al., 2002; Крутецкая и др., 2003в). Аналогичные данные были получены и для лягушки *Rana pipiens* (Chalfant et al., 1996).

Механизмы, опосредующие влияние ПКС на ENaC в реабсорбирующих эпителиях, в настоящее время неясны. Обнаружено, что в клетках почки, эпителии кожи амфибий и некоторых других реабсорбирующих эпителиях ПКС может изменять функциональные характеристики ENaC (в первую очередь вероятность открытого состояния канала) предположительно путем прямого фосфорилирования субъединиц ENaC. Участки фосфорилирования для ПКС обнаружены на цитоплазматическом С-конце α -субъединицы ENaC, тогда как соответствующие сегменты двух других субъединиц ENaC, по

всей вероятности, не имеют в своем составе участков фосфорилирования для данного фермента или же фосфорилирование ПКС β - и γ -субъединиц ENaC не влияет на функционирование канала (Volk et al., 2000). Фосфорилирование ферментом субъединиц ENaC, по-видимому, является механизмом быстрой регуляции активности ENaC (Els et al., 1998; Awayda, 2000; Volk et al., 2000; Awayda et al., 2002). Однако фосфорилирование белков ENaC, по-видимому, не является единственным механизмом регуляции активности данного типа каналов ПКС. В пользу этого свидетельствуют данные о способности ПКС оказывать хроническое влияние на активность ENaC. Так, показано, что длительная активация ПКС приводит к изменению уровня синтеза белков β - и γ -субъединиц ENaC (Stockand et al., 2000). ПКС участвует также в регуляции встраивания или удаления субъединиц ENaC из мембраны (Snyder, 2005).

Активность некоторых типов ионных каналов, в том числе ENaC, может прямо модулироваться мембранными липидами и особенно фосфоинозидами (Păunescu et al., 2000; Tong et al., 2004). Показано, что нарушение взаимодействия фосфоинозитидов и ENaC приводит к тяжелым патологическим состояниям (Tong et al., 2004).

Ключевую роль в метаболизме фосфоинозитидов играют ФИ-киназы (Foster et al., 2003). Известно, что ФИ-3- и ФИ-4-киназы регулируют различные пути метаболизма фосфоинозитидов. Так, фосфорилирование ФИ-4-киназой ФИ в положении С-4 приводит к образованию ФИ-4-фосфата, предшественника ФИ-4,5-дифосфата, являющегося субстратом для фосфолипазы С.

ФИ-3-киназа фосфорилирует ФИ в положении С-3, что приводит к образованию трех липидных мессенджеров — ФИ-3-фосфата, ФИ-3,4-дифосфата и ФИ-3,4,5-трифосфата, которые не являются субстратом для фосфолипазы С (Cantrell, 2001). Эти липиды связываются с РН-доменами белков и регулируют активность и внутриклеточную локализацию большого числа сигнальных молекул. Известно, что ФИ-3-киназа является также протеинкиназой, фосфорилирующей белки по остаткам серина и треонина (Rameh, Cantley, 1999; Cantrell, 2001), а также вовлечена в белок-белковые взаимодействия с широким спектром белков, имеющих в своем составе SH_3 - и РН-домены (Rameh, Cantley, 1999; Cantrell, 2001; Foster et al., 2003).

В последнее время появляются сообщения о том, что в различных реабсорбирующих эпителиях ФИ-3-киназы принимают участие в регуляции активности ENaC некоторыми гормонами, таким как альдостерон (Blazer-Yost et al., 1999; Helms et al., 2005), вазопрессин (Edinger et al., 1999) и инсулин (Record et al., 1998; Blazer-Yost et al., 2003, 2004). Несмотря на то что регуляция метаболизма фосфоинозитидов фосфоинозитид-специфически киназами интенсивно исследуется, роль этих киназ в модуляции ионного транспорта через поляризованные клетки эпителия еще мало изучена.

С помощью метода фиксации потенциала нами было показано, что эффективный блокатор ФИ-киназ вертманнин подавляет транспорт Na^+ в коже лягушки, модулируя активность ENaC (Крутецкая и др., 2003б). Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что влияние вертманнина на транспорт Na^+ в коже лягушки зависит от концентрации и различается при приложении агента со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи. Подобные различия связаны, по-видимому, с тем, что в регуляцию транспорта Na^+ в коже

лягушки вовлечены различные типы ФИ-киназ, различающиеся по чувствительности к ингибиторам, внутриклеточной локализации и выполняемым функциям. Обнаружено, что в регуляции транспорта Na^+ в коже лягушки *Rana temporaria* участвуют как ФИ-3-, так и ФИ-4-киназы. При этом ФИ-3- и ФИ-4-киназы, взаимодействующие с сигнальными комплексами, расположенными в базолатеральной мембране, имеют сходный механизм влияния на активность ENaC и транспорт Na^+ , тогда как регуляторное влияние на транспорт Na^+ ФИ-3- и ФИ-4-киназ, ассоциированных с сигнальными каскадами в апикальной мембране, осуществляется, по-видимому, с помощью различных механизмов. Показано также, что влияние ФИ-киназ на транспорт Na^+ в коже лягушки зависит от структурно-функциональной организации актинового цитоскелета (Melnitskaya et al., 2005).

Можно выделить три следующих механизма регуляции активности ENaC ФИ-киназами в различных эпителиальных системах.

1. Прямая модуляция активности ENaC фосфорилированными производными ФИ, образующимися при действии ФИ-киназ. Известно, что отрицательно заряженные производные ФИ (в первую очередь ФИ-4,5-дифосфат и ФИ-4-фосфат) активируют различные типы ионных каналов, в том числе неселективные катионные каналы (Zhainazarov, Ache, 1999), АТФ-чувствительные K^+ -каналы (Hilgemann, Ball, 1996; Schulze et al., 2003), K^+ -каналы входящего выпрямления (Rohacs et al., 2003; Schulze et al., 2003) и ENaC (Păunescu et al., 2000; Ma et al., 2002; Tong et al., 2004).

На клетках А6 показано, что стимулирующее действие на ENaC оказывают не только ФИ-4,5-дифосфат и ФИ-4-фосфат, но и ФИ-3,4-дифосфат и ФИ-3,4,5-трифосфат, которые вызывают увеличение плотности и вероятности открытого состояния канала (Păunescu et al., 2000; Yue et al., 2002; Tong et al., 2004; Pochynyuk et al., 2005). В то же время фосфорилированные производные ФИ изменяют вероятность открытого состояния канала, но не влияют на плотность ENaC в апикальной мембране клеток А6 (Ma et al., 2002).

В качестве возможного механизма регуляции активности ENaC фосфолипидами некоторые авторы рассматривают возможность непосредственного взаимодействия отрицательно заряженных производных ФИ с белком канала. Так, на цитоплазматическом N-конце β - и γ -субъединиц ENaC обнаружены участки, содержащие положительно заряженные аминокислоты, делеция которых существенно снижает активность канала. Предполагают, что взаимодействие этих участков с анионными фосфолипидами внутреннего монослоя мембраны способно модулировать активность ENaC (Ma et al., 2002; Tong et al., 2004). Недавно было обнаружено, что для взаимодействия ENaC с ФИ-3,4,5-трифосфатом также важен участок, расположенный непосредственно после второго трансмембранного домена γ -субъединицы ENaC (аминокислотные остатки 569—583) (Pochynyuk et al., 2005).

2. Регуляция ENaC осуществляется посредством различных сигнальных каскадов, запускаемых липидными продуктами, образующимися в результате фосфорилирования ФИ ФИ-киназами.

Известно, что катализируемое ФИ-киназами образование фосфорилированных производных ФИ является начальным этапом многих сигнальных каскадов, регулирующим активность различных посредников и клеточных элементов. Кроме того, ФИ-3-киназы имеют двой-

ную энзиматическую активность, объединяя в себе функции протеин- и ФИ-киназ. Внутриклеточными мишенями ФИ-3-киназ являются такие важные регуляторные белки, как ПКС, фосфоинозитидзависимые киназы, малые G-белки и многие другие, активность которых регулируется как посредством их взаимодействия с липидными продуктами ФИ-3-киназ, так и путем прямого фосфорилирования этих белков ФИ-3-киназами (Rameh, Cantrell, 1999; Cantrell, 2001).

Известно, что модуляция активности некоторых типов ионных каналов и других мембранных белков осуществляется с участием запускаемых ФИ-3-киназами сигнальных каскадов, регулирующих преимущественно процессы везикулярного транспорта и(или) белкового синтеза (Cantrell, 2001). ФИ-3-киназам принадлежит также важная роль в регуляции процессов эндо- и экзоцитоза. Так, показано, что активность Na^+/K^+ -АТФазы в клетках почки опоссума (клетки ОК) (Yudowski et al., 2000) и некоторых изоформ Na^+/H^+ -обменников в клетках яичника (клетки AP-1) (Kurashima et al., 1998) и в нейронах млекопитающих (Szász et al., 2002) регулируется путем стимуляции ФИ-3-киназами процессов эндоцитоза. Обнаружено, что ФИ-3-киназы участвуют в регуляции ENaC многими гормонами, такими как альдостерон, инсулин и вазопрессин (Blazer-Yost et al., 1998, 1999, 2003; Record et al., 1998; Edinger et al., 1999; Păunescu et al., 2000; Пашина, 2004). Блокирование ФИ-киназ предотвращает или существенно снижает как быстрое, так и хроническое стимулирующее влияние этих гормонов на транспорт Na^+ в различных типах реабсорбирующих эпителиев.

3. Непосредственное взаимодействие между ФИ-киназами и ENaC, регулирующее встраивание и(или) доставку каналов к апикальной мембране.

Подобное взаимодействие возможно благодаря наличию богатых пролином зон, обнаруженных на цитоплазматическом C-конце всех трех субъединиц ENaC, напоминающих участки взаимодействия с SH_3 -доменами, которые вовлечены в белок-белковые взаимодействия (Garty, Palmer, 1997). Субъединица α ENaC содержит два таких участка (PxxPPPxxP и PPxxxxPPPx) (Benos, Stanton, 1999). Показано, что в условиях *in vitro* она взаимодействует с рядом белков, имеющих SH_3 -домен, в том числе с α -спектрином (Benos, Stanton, 1999). В то же время β - и γ -субъединицы ENaC содержат последовательность аминокислот (PxPxxP), которая является возможным участком связывания SH_3 -домена регуляторной (p85) субъединицы ФИ-3-киназ (типа IA) (Yu et al., 1994; Blazer-Yost et al., 2003). При этом участок связывания SH_3 -домена частично перекрывается с PY-сегментом — последовательностью аминокислот (PPPXY), отвечающей за взаимодействие ENaC с убиквитиновой лигазой Nedd 4, регулирующей деградацию канала (Price, Welsh, 1999). Подобное взаимодействие рассматривается в качестве одного из возможных механизмов регуляции экспрессии ENaC.

Роль арахидоновой кислоты и продуктов ее метаболизма в регуляции активности ENaC

В последние годы получены данные, позволяющие рассматривать арахидоновую (эйкозатетраеновую) кислоту и ее продукты в качестве вторичных посредников в передаче сигнала (Bevan, Wood, 1987). Во многих случаях показано, что арахидоновая кислота и ее производные

могут взаимодействовать с сигнальными молекулами различных путей передачи информации в клетке, модулируя их сигналы (Axelrod, 1990). Кроме того, арахидоновая кислота и ее метаболиты, выделяясь из клеток, могут активировать рецепторы той же клетки или окружающих клеток, регулируя при этом различные физиологические процессы, такие как иммунный ответ, секреция и др. (Irvine, 1982; Крутецкая и др., 2003а).

В почках и многих других реабсорбирующих эпителиях арахидоновая кислота и ее производные участвуют в регуляции транспорта Na^+ и K^+ (Barry, Hall, 1969; Bjerregaard, Nilsen, 1990; Cantiello et al., 1990; Gerencser, 1993; Rytved et al., 1995, 1996; Els, Helman, 1998; Feraille, Doucet, 2001; Carattino et al., 2003; Mies et al., 2004). Показано, что арахидоновая кислота и другие полиненасыщенные жирные кислоты могут прямо или опосредованно регулировать активность ионных каналов различных типов (Ordway et al., 1991).

Обнаружено, что активность ENaC, экспрессированных в ооцитах *Xenopus laevis*, подавляется при перфузии 50 мкМ арахидоновой кислоты. При этом ингибирующее действие арахидоновой кислоты и ее неметаболизируемого аналога 5,8,11,14-эйкозатетраиновой кислоты на ENaC связано с уменьшением экспрессии каналов в мембране путем блокирования экзоцитоза и стимуляции эндоцитоза (Carattino et al., 2003). Ингибирование активности ENaC арахидоновой кислотой показано также для клеток CCD крысы (Wei et al., 2004) и клеток А6 (Worrell et al., 2001). В то же время имеются данные о том, что в клетках А6 введение арахидоновой кислоты стимулирует активность ENaC путем увеличения числа открытых каналов в мембране (Cantiello et al., 1990) или не оказывает влияния на активность ENaC (Mies et al., 2004). В клетках А6 активность ENaC стимулируется также ω 3-полиненасыщенными жирными кислотами, такими как эйкозапентаеновая (С 20 : 5) и докозагексаеновая (С 22 : 6) кислоты, которые вызывают увеличение вероятности открытого состояния канала (Mies et al., 2004). Влияние арахидоновой кислоты на ENaC также может быть связано с изменениями в организации липидного бислоя при действии экзогенной кислоты (McIntosh et al., 1999).

Показано, что в регуляции активности ENaC и транспорта Na^+ в реабсорбирующих эпителиях, в том числе в эпителии кожи и мочевого пузыря амфибий, важную роль играет простагландин E_2 (PGE_2) (Bjerregaard, Nilsen, 1990; Gerencser, 1993; Rytved et al., 1995, 1996; Els, Helman, 1998). Помимо PGE_2 способностью модулировать транспорт Na^+ в эпителиальных тканях обладают некоторые другие продукты циклооксигеназного пути окисления арахидоновой кислоты (простаноиды), такие как простагландины PGE_1 (Fassina, Contessa, 1967; Barry, Hall, 1969), $\text{PGE}_{2\alpha}$ и PGD_2 (Gerencser, 1993). Имеются сообщения о том, что и другие биологически активные производные арахидоновой кислоты, например продукты липоксигеназного пути ее окисления — лейкотриены, — стимулируют транспорт Na^+ в клетках А6 почки амфибий (Cantiello et al., 1990) и некоторых других эпителиальных тканях (Smith et al., 1988). Ингибирующая роль продуктов эпоксигеназного пути окисления арахидоновой кислоты показана для клеток CCD крысы (Wei et al., 2004).

Показано, что PGE_2 (Rytved et al., 1995, 1996; Els, Helman, 1998) и PGE_1 (Fassina, Contessa, 1967; Barry, Hall, 1969) при добавлении их со стороны базолатераль-

ной поверхности кожи стимулируют транспорт Na^+ в эпителии кожи различных видов лягушек путем увеличения Na^+ -проницаемости апикальной мембраны (Els, Helman, 1981; Helman et al., 1983). В этом случае стимулирующее влияние простагландинов на ENaC связано с существенным увеличением числа открытых каналов в мембране и незначительным снижением вероятности открытого состояния канала (Els, Helman, 1997). Транспорт Na^+ в коже лягушки стимулируется также эндогенной продукцией PGD_2 . Образование PGE_2 может инициироваться при добавлении со стороны базолатеральной поверхности кожи агентов, повышающих внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} , таких как Ca^{2+} -ионофор A23187 (Erljij et al., 1986) или ингибитор Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргин (Rytved et al., 1995). В то же время добавление тапсигаргина со стороны апикальной поверхности кожи лягушки снижает трансэпителиальный транспорт Na^+ , вызывая уменьшение Na^+ -проницаемости апикальной мембраны и K^+ -проницаемости базолатеральной (Rytved et al., 1995). Показано, однако, что в этом случае продукты циклооксигеназного или липоксигеназного пути окисления арахидоновой кислоты не вовлечены в регуляцию транспорта Na^+ (Brodin et al., 1996).

Известно, что PGE_2 способен модулировать влияние вазопрессина на транспорт Na^+ в коже лягушки (Rytved et al., 1996), мочевого пузыря жабы (Schlondorff, Satriano, 1985) и клеток CCD (Holt, Lechene, 1981), предотвращая стимулирующее действие гормона. Причем в различных эпителиальных тканях модулирующее влияние PGE_2 реализуется посредством различных механизмов. Наиболее вероятно, что это обусловлено существованием нескольких типов рецепторов для простагландинов, каждый из которых ассоциирован с различными сигнальными каскадами. В настоящее время известны по крайней мере четыре фармакологически различных типа рецепторов (EP-рецепторов) для PGE_2 и других простагландинов, идентифицированных во многих возбудимых и невозбудимых тканях, в том числе в различных реабсорбирующих эпителиях (Coleman et al., 1994). Все известные типы простаноидных рецепторов принадлежат к суперсемейству рецепторов, связанных с большими G-белками (Toh et al., 1995). Влияние на активность ENaC сигнальных каскадов, регулируемых простаноидными рецепторами, наиболее подробно изучено на различных сегментах нефрона почки позвоночных. Типы EP-рецепторов, экспрессируемых в дистальных отделах нефрона, и их влияние на активность ENaC представлены на рис. 6.

Известно, что в клетках CCD PGE_2 и PGE_1 являются агонистами простаноидных рецепторов типов EP₂ и EP₄, локализованных в базолатеральной мембране (Breuer, Breuer, 2000). В дистальных сегментах нефрона и клетках CCD ингибирующее влияние $\text{PGE}_{2\alpha}$ на транспорт Na^+ опосредуется связыванием с локализованным в базолатеральной мембране простаноидным рецептором типа EP₁ (Breuer, Breuer, 2000). Известно также, что в эпителии кожи лягушки модулирующее влияние PGE_2 на эффект вазопрессина (проявляющееся в снижении индуцируемого вазопрессинном увеличения $[\text{cAMF}]_i$) опосредуется связыванием PGE_2 с рецептором типа EP₃, ассоциированным с G_i-белками, ингибирующими активность аденилатциклазы (Rytved et al., 1996). При этом наиболее вероятно, что модифицирующее влияние PGE_2 на эффект вазопрессина не связано с увеличением внутриклеточной концентрации Ca^{2+} (Rytved et al., 1996), которое

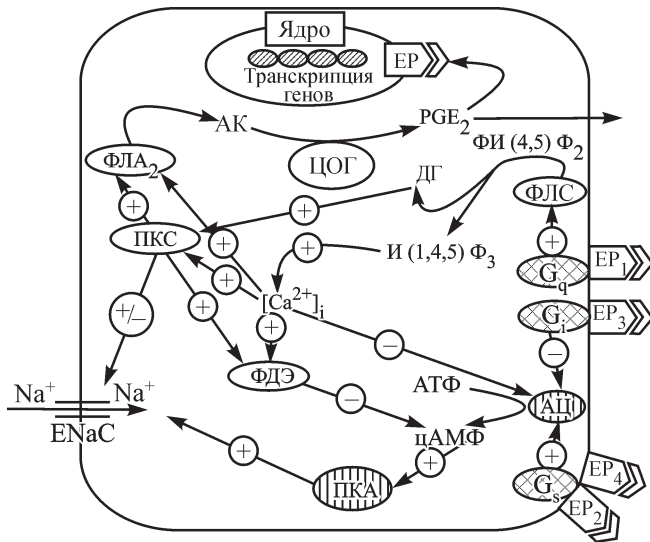


Рис. 6. Простагландинные рецепторы в дистальных отделах нефрона почки позвоночных и их влияние на ENaC.

ENaC — амилорид-чувствительные Na^+ -каналы; EP₁, EP₂, EP₃ и EP₄ — простагландинные рецепторы, связанные с гетеротримерными G-белками, стимулирующими (G_s) или ингибирующими (G_i) активность аденилатциклазы, или стимулирующими (G_q) активность фосфолипазы C; АЦ — аденилатциклаза; АТФ — аденозинтрифосфат; цАМФ — циклический аденозинмонофосфат; ПКА — цАМФ-зависимая протеинкиназа А; ФЛС — фосфолипаза С; ДГ — диацилглицерин; И(1,4,5)Ф₃ — инозитол-1,4,5-трифосфат; ПКС — протеинкиназа С; $[\text{Ca}^{2+}]_i$ — увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ; ФДЭ — фосфодиэстераза; ФЛА₂ — фосфолипаза А₂; АК — арахидоновая кислота; ЦОГ — циклооксигеназа; PGE₂ — простагландин Е₂.

показано для клеток CCD. В клетках CCD млекопитающих простагландины снижают стимулирующее действие вазопрессина путем активации рецептора типа EP₁ и увеличения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Holt, Lechene, 1981; Jaisser et al., 1989; Breyer, Breyer, 2000). Известно, что в клетках почки обнаружена изоформа аденилатциклазы AC5, ингибируемая Ca^{2+} (Sunahara, Taussing, 2002). Вероятно, что в этом случае ингибирующее действие простагландинов обусловлено подавлением активности аденилатциклазной системы вследствие увеличения $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Таким образом, клеточный ответ на добавление эйкозаноидов часто является тканеспецифичным (Gegenster, 1993; Els, Helman, 1998). Кроме того, несмотря на то что арахидоновая кислота и ее производные играют важную роль в модуляции активности ENaC во многих реабсорбирующих эпителиях, в настоящее время не существует единого механизма для объяснения регуляции эйкозаноидами активности ENaC в эпителиальных клетках.

Регуляция активности ENaC тирозинкиназами и тирозинфосфатазами

Несмотря на то что фосфорилирование белков по остаткам тирозина является более редким событием по сравнению с фосфорилированием по остаткам серина или треонина, установлено, что процессы фосфорилирования (дефосфорилирования) остатков тирозина являются общим элементом путей внутриклеточной сигнализации, выполняющим важную роль во многих клеточных процессах, таких как пролиферация, рост и дифференцировка (Крутецкая и др., 2003а).

Выделяют 2 типа тирозинкиназ и тирозинфосфатаз — рецепторные и цитоплазматические (Fischer et al., 1991; Hunter, 1996). Рецепторные тирозинкиназы связаны с рецепторами ростовых факторов (эпидермального, инсулиноподобного и др.) (Cadena, Gill, 1992). На основании сходства структурных элементов выделяют 14 типов рецепторных тирозинкиназ (Schlessinger, Ullrich, 1992). Активированные рецепторные тирозинкиназы передают информацию путем фосфорилирования белков, содержащими SH₂- и SH₃-домены (Schlessinger, Ullrich, 1992). Цитоплазматические тирозинкиназы обнаружены как в цитоплазме, так и в клеточном ядре. Многие из них участвуют в процессах внутриклеточной сигнализации. Например, тирозинкиназы семейств Src, Jak и Fak прямо участвуют в процессах трансмембранной передачи сигнала, выступая в качестве каталитических субъединиц мембранных рецепторов, не имеющих собственной тирозинкиназной активности (Hunter, 1996).

Тирозинфосфатазы принадлежат к большому (более 75 членов) и разнообразному суперсемейству белков, обнаруженных у всех эукариот (Fischer et al., 1991). Тирозинфосфатазы специфически дефосфорилируют остатки тирозина и ослабляют сигналы, генерируемые тирозинкиназами. Выделено семь семейств рецепторных тирозинфосфатаз, различающихся в основном структурой экстраклеточных доменов (Hunter, 1996). Некоторые семейства нерецепторных тирозинфосфатаз (PTP1C и PTP1D) содержат в области N-конца молекулы два SH₂-домена, которые позволяют им связываться с активированными рецепторными тирозинкиназами (Fischer et al., 1991; Крутецкая, Лебедев, 2000).

Показано, что как рецепторные, так и нерецепторные тирозинкиназы и тирозинфосфатазы участвуют в регуляции активности ENaC (Tilly et al., 1993; Davis et al., 2001). В различных реабсорбирующих эпителиях тирозинкиназы опосредуют регуляторное действие на ENaC инсулина (Hagiwara et al., 1992; Matsumoto et al., 1993; Rodriguez-Commes et al., 1994) и факторов роста (инсулиноподобного и эпидермального) (Davis et al., 2001; Tong, Stockand, 2005). В клетках почки амфибий тирозинкиназы вовлечены также в увеличение транспорта Na^+ , стимулируемое уменьшением осмотической концентрации раствора, омывающей апикальную поверхность клетки (Niisato et al., 2000).

Результаты многих экспериментов свидетельствуют о том, что в клетках А6 тирозинкиназы участвуют преимущественно в регуляции процесса встраивания ENaC в мембрану (Matsumoto et al., 1993; Niisato et al., 2000), тогда как в клеточных культурах дистальных сегментов нефрона млекопитающих активация эпидермальным фактором роста рецепторных тирозинкиназ вызывает снижение транспорта Na^+ , обусловленное значительным снижением вероятности открытого состояния ENaC (Tong, Stockand, 2005).

Регуляция активности ENaC инсулином

Способность инсулина стимулировать транспорт Na^+ через мембраны эпителиальных клеток амфибий впервые была продемонстрирована в 1965 г. (Nerga, 1965). В дальнейшем было показано, что инсулин активирует рецептор, расположенный на базальной мембране (Cox, Singer, 1977), и вызывает временное увеличение транс-

эпителиального транспорта Na^+ , которое не зависит от изменения уровня транскрипции генов или синтеза белков *de novo* (Cox, Singer, 1977; Weisman et al., 1977).

При исследовании влияния инсулина на транспорт Na^+ в коже лягушки *Rana temporaria* нами было обнаружено, что добавление 0.5—1.0 мкМ инсулина в раствор, омывающий базолатеральную (серозную) поверхность кожи, существенно увеличивает транспорт Na^+ . Увеличение транспорта Na^+ сопровождается сдвигом трансэпителиального потенциала в сторону гиперполяризации и увеличением полной трансэпителиальной проводимости (Крутецкая, Лебедев, 1998; Пашина и др., 2004).

В эпителии кожи лягушки и других эпителиальных тканях инсулин вызывает быстрое увеличение проницаемости апикальной мембраны для Na^+ (Schoen, Erlj, 1987). Стимулирующее влияние гормона на транспорт Na^+ в таких модельных объектах, как эпителий мочевого пузыря или клетки А6, связано с увеличением числа открытых Na^+ -каналов в мембране (Baxendale, 1988; Erlj et al., 1994; Blazer-Yost et al., 1996). Однако согласно другим данным, стимуляция инсулином транспорта Na^+ в клетках А6 обусловлена увеличением вероятности открытого состояния ЕNaС (Marunaka et al., 1992).

Влияние инсулина на транспорт Na^+ в реабсорбирующих эпителиях является предметом интенсивных исследований в течение последних десятилетий. Однако механизмы, лежащие в основе этого процесса, по-прежнему неизвестны. Инсулин оказывает влияние на широкий спектр внутриклеточных процессов, в связи с чем предполагают несколько механизмов для объяснения стимулирующего влияния гормона на транспорт Na^+ в эпителиальных системах.

Активация тирозинкиназ. Известно, что рецептор инсулина принадлежит к суперсемейству рецепторов, имеющих собственную тирозинкиназную активность (Cadena, Gill, 1992). После связывания с гормоном происходит быстрое аутофосфорилирование С-терминальных остатков тирозина на молекуле рецептора (Saltiel, 1996). В результате аутофосфорилирования рецептора создаются условия фосфорилирования по остаткам тирозина эндогенных субстратов и образуются участки для связывания белков, содержащих SH_2 - и SH_3 -домены (Cadena, Gill, 1992). Показано, что многие из эффектов инсулина связаны с активацией присущей ему тирозинкиназной активности (Rodriguez-Commes et al., 1994). Специфические ингибиторы тирозинкиназ (генистейн, тирфостин-23 и лавендустин А) вызывают значительное снижение стимулирующего влияния инсулина на транспорт Na^+ в различных эпителиях (Hagiwara et al., 1992; Matsumoto et al., 1993; Rodriguez-Commes et al., 1994; Крутецкая, Лебедев, 1998). Таким образом, активация инсулином тирозинкиназ является важным этапом в стимуляции инсулином транспорта Na^+ .

С помощью ингибиторного анализа нами исследована роль тирозинкиназ во влиянии инсулина на транспорт Na^+ в коже лягушки *Rana temporaria*. Использовали природный специфический ингибитор тирозинкиназ изофлавоноид генистейн, конкурентно блокирующий связывание АТФ с тирозинкиназами, и стабильный аналог эрбстатина метил-2,5-дигидроксициннамат. Обнаружено, что предварительная обработка (в течение 1 ч) апикальной поверхности кожи лягушки генистейном (100 мкМ) или метил-2,5-дигидроксициннаматом (10—20 мкМ) значительно ослабляет, а в некоторых случаях полностью предотвращает последующее действие инсулина

(Крутецкая, Лебедев, 1998). Сходные данные были получены и для других эпителиальных систем, таких как клетки А6 (Rodriguez-Commes et al., 1994). Полученные данные свидетельствуют о необходимости фосфорилирования белков-мишеней по тирозину для реализации влияния инсулина на трансэпителиальный транспорт Na^+ .

Активация Na^+/K^+ -АТФазы. Инсулин способен активировать Na^+/K^+ -АТФазу в различных возбудимых и невозбудимых тканях. В эпителиальных клетках увеличение активности Na^+/K^+ -АТФазы приводит к снижению $[\text{Na}^+]_i$, которое в свою очередь стимулирует ЕNaС и увеличивает транспорт Na^+ . Подобный механизм долгое время считался основой стимулирующего эффекта инсулина на транспорт Na^+ (Rodriguez-Commes et al., 1994). Однако дальнейшие исследования показали, что первичным является увеличение Na^+ -проницаемости апикальной мембраны, сопровождающееся снижением сопротивления мембраны и деполаризацией мембранного потенциала (Schoen, Erlj, 1987; Rodriguez-Commes et al., 1994). При этом именно повышение $[\text{Na}^+]_i$ вторично вызывает активацию Na^+/K^+ -АТФазы. Такой механизм действия инсулина был предложен для ряда объектов (Ewart, Klip, 1995).

Увеличение внутриклеточной концентрации цАМФ. Быстрое стимулирующее влияние инсулина на транспорт Na^+ , не зависящее от изменения активности генов, сходно с влиянием на транспорт Na^+ некоторых гормонов и фармакологических агентов, вызывающих увеличение $[\text{цАМФ}]_i$, таких как, например, вазопрессин (Weisman et al., 1977). Наиболее вероятно, что в отличие от вазопрессина стимулирующий эффект инсулина на трансэпителиальный транспорт Na^+ опосредуется не активацией аденилатциклазы и увеличением $[\text{цАМФ}]_i$, а иным способом. Подтверждением этого предположения могут служить следующие экспериментальные данные. Во-первых, действие инсулина на аденилатциклазу является по меньшей мере тканеспецифичным. Так, в эпителии мочевого пузыря жабы и клетках А6 инсулин не вызывает существенных изменений $[\text{цАМФ}]_i$ (Rodriguez-Commes et al., 1994), тогда как в клетках ССД мышцы значительно увеличивает $[\text{цАМФ}]_i$ (Mandon et al., 1993). Кроме того, имеются сообщения о том, что во многих тканях инсулин вызывает снижение $[\text{цАМФ}]_i$ (Krahl, 1974; Ito et al., 1995).

Увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Инсулин вызывает дозозависимое увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} во многих типах эпителиальных тканей (Rodriguez-Commes et al., 1994; Garty, Palmer, 1997). Наиболее вероятно, что инсулин вызывает высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточного депо, так как индуцируемое гормоном увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ наблюдается как при наличии, так и в отсутствие ионов Ca^{2+} в наружном растворе (Rodriguez-Commes et al., 1994). В то же время имеются данные о том, что антинатрийуретический эффект инсулина полностью предотвращается блокатором Ca^{2+} -каналов верапамилом (Ito et al., 1995). Исследование роли Ca^{2+} в стимуляции транспорта Na^+ инсулином в клетках ССД мышцы показало, что стимулирующий эффект гормона опосредован воздействием на Ca^{2+} -кальмодулиновую систему и не зависит от входа Ca^{2+} в клетку (Ito et al., 1995).

Активация ПКС. Обнаружено, что инсулин стимулирует синтез фосфатидной кислоты и увеличение внутриклеточной концентрации диацилглицерина, являющегося природным активатором ПКС (Civan et al., 1989). Специфические ингибиторы ПКС существенно

снижают стимулирующий эффект инсулина на транспорт Na^+ и активность ENaC в различных эпителиальных клетках (Civan et al., 1988, 1989; Mandon et al., 1993; Rodriguez-Commes et al., 1994; Ito et al., 1995). Механизм активации инсулином ПКС в настоящее время неизвестен.

Активация ФИ-киназ. Аутофосфорилирование инсулинового рецептора вызывает высвобождение участков для связывания белков, содержащих SH_2 - и SH_3 -домены, и создает условия для фосфорилирования по остаткам тирозина различных эндогенных субстратов (Cadena, Gill, 1992; Крутецкая и др., 2003а). Важнейшей мишенью тирозинкиназы инсулинового рецептора является субстрат инсулинового рецептора IRS (IRS 1 и IRS 2). Фосфорилированный IRS связывается с белками, содержащими SH_2 -домен, такими как ФИ-3-киназа, тирозинфосфатазы SH-PTP2 (PTP1D) или SH-PTP1 (PTP1C), белок GRB2 и белок Nck (Cadena, Gill, 1992; Shepherd et al., 1996).

В последние годы появляется все больше данных об участии ФИ-3-киназ в регуляции инсулином транспорта Na^+ в различных реабсорбирующих эпителиях (Record et al., 1998; Blazer-Yost et al., 2003; Markadieu et al., 2004). На коже *Rana temporaria* нами показано, что ингибитор ФИ-киназ вертманнин значительно снижает стимулирующее влияние инсулина на транспорт Na^+ (Пашина, 2004). В то же время пути передачи сигнала от ФИ-3-киназ к компонентам системы транспорта Na^+ в настоящее время неизвестны.

Независимыми исследовательскими группами показано, что после индуцируемой инсулином активации ФИ-3-киназ происходит быстрое увеличение количества фосфорилированных производных ФИ, таких как ФИ-3, 4-дифосфат и ФИ-3,4,5-трифосфат (Record et al., 1998; Markadieu et al., 2004). В пользу того, что ФИ-3,4-дифосфат и ФИ-3,4,5-трифосфат необходимы для реализации стимулирующего эффекта инсулина на транспорт Na^+ , свидетельствуют также данные о том, что трансфекция в клетки А6 ФИ-3-фосфатазы (PTEN), превращающей ФИ-3,4,5-трифосфат в ФИ-4,5-дифосфат, существенно снижает индуцируемое инсулином увеличение транспорта Na^+ (Markadieu et al., 2004).

В последнее время показано, что в клетках А6 ФИ-3,4,5-трифосфат, генерируемый ФИ-3-киназами в базолатеральной мембране в ответ на добавление инсулина, быстро диффундирует по внутреннему монослойу мембраны, минуя интегральные белки и плотные клеточные контакты, в апикальную мембрану (Blazer-Yost et al., 2004). По-видимому, изменение липидного состава апикальной мембраны способствует встраиванию преэспрессированных субъединиц Na^+ -каналов (Blazer-Yost et al., 2004) или активирует уже имеющиеся ENaC (Markadieu et al., 2004; Tong et al., 2004). В клетках А6 инсулин вызывает также временное увеличение площади поверхности апикальной мембраны и объема клетки, что тоже может являться возможным механизмом, опосредующим влияние гормона на различные Na^+ -транспортирующие белки (Lang et al., 1998; Blazer-Yost et al., 2004).

Роль элементов цитоскелета в регуляции ENaC

Цитоскелет играет ведущую роль в таких важнейших процессах, как секреция, абсорбция, межклеточные взаимодействия и деление клеток.

В связи с многообразием функций эпителиальные клетки характеризуются широким разнообразием организации и компонентного состава элементов цитоскелета. Апикальный и базолатеральный домены поляризованных клеток эпителия различаются по организации цитоскелета.

Микрофиламенты играют ключевую роль в формировании кортикального цитоскелета, а также входят в состав клеточных контактов: плотных (регулирующих процессы парацеллюлярного транспорта), промежуточных, щелевых и фокальных. Кроме того, отдельные микрофиламенты или их пучки пронизывают всю цитоплазму эпителиальных клеток (Pratley, McQuillen, 1973; Brown, Stow, 1996; Janmey, 1998; Ku et al., 1999).

Эпителиальные клетки имеют развитую систему микротрубочек. От микротрубочек отходят нити диаметром 2—4 нм, многие из которых оканчиваются на пигментных гранулах и других структурах (Фултон, 1987).

Третья основная фибриллярная система — сеть промежуточных филаментов — в эпителии наиболее разнообразна и наиболее специализирована. В клетках эпителия кожи лягушки промежуточные филаменты представлены несколькими типами цитокератиновых и виментиновых волокон (Farquhar, Palade, 1965).

Известно, что трехмерная внутриклеточная сеть, формируемая всеми тремя типами филаментов, является универсальным связующим механизмом между клетками, а также между окружающей и внутриклеточной средами, опосредующим изменение активности различных сигнальных молекул и мембранных переносчиков (в том числе ионных каналов) в ответ на различные вне- и внутриклеточные стимулы. В настоящее время известно, что элементы актинового цитоскелета и микротрубочки оказывают существенное влияние на активность ENaC, в то время как роль промежуточных филаментов в регуляции активности данного типа каналов практически не изучалась.

Роль микротубулярного аппарата. Транспорт везикул, содержащих ионные каналы или переносчики, осуществляемый с участием микротрубочек, необходим для встраивания (удаления) белков в мембрану и обеспечивает поддержание внутреннего гомеостаза клетки. Движение везикул вдоль микротрубочек обеспечивается при помощи белков, ассоциированных с микротрубочками (БАМ). БАМ — это в первую очередь крупные АТФазные комплексы кинезина и цитоплазматического денеина, использующие энергию гидролиза АТФ для однонаправленного перемещения вдоль микротрубочек, а также ряд вспомогательных белковых факторов, например белки, входящие в состав денеин-динактоинового комплекса (Schroer, Sheetz, 1991).

Цитоплазматические микротрубочки ориентированы преимущественно перпендикулярно апикальной мембране, причем медленно растущие минус-концы микротрубочек локализованы в области, прилегающей к апикальной мембране, тогда как быстро растущие плюс-концы пронизывают всю клетку и направлены к базальной мембране (Hamm-Alvarez, Sheetz, 1998). Подобное пространственное распределение микротрубочек является одним из механизмов создания и поддержания структурно-функциональной асимметрии противоположно ориентированных доменов поляризованной эпителиальной клетки. Однако в некоторых эпителиальных клетках (в том числе в клетках проксимальных и дистальных отделов собирательных трубочек почки позвоночных) в области, при-

легающей к апикальной мембране, обнаружена плотная сеть из микротрубочек, ориентированных параллельно этой мембране (Brown, Stow, 1996). Предполагают, что вертикально и латерально ориентированные микротрубочки выполняют различные функции в процессах везикулярного транспорта (Brown, Stow, 1996).

Разрушение микротрубочек приводит к подавлению стимулирующего влияния гормонов на транспорт Na^+ или предотвращению развития адаптивных реакций в клетках осморегулирующих эпителиев (Parisi et al., 1985; Parczyk et al., 1989; Verrey et al., 1995; Marples et al., 1996). Данные о влиянии микротрубочек на транспорт Na^+ очень противоречивы. Существуют работы, в которых показано, что изменение структуры микротубулярного аппарата вызывает ингибирование ENaC (Morris et al., 1995) или не оказывает существенного влияния (Els, Chou, 1993) на их активность и транспорт Na^+ в коже лягушки и аналогичных модельных объектах.

Нами было установлено, что реорганизация тубулинового цитоскелета непосредственно влияет на транспорт Na^+ в коже *Rana temporaria* в отсутствие дополнительных стимулирующих или ингибирующих воздействий. Агенты, вызывающие деполимеризацию микротрубочек (колхицин, колцемид и винбластин), ингибируют активность ENaC и подавляют транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки (Пашина и др., 2003; Крутецкая и др., 2004; Pashina et al., 2004). Таксол, выделяемый из *Taxus brevifolia* (в отличие от других антимитотических агентов, таких как колхицин, колцемид, нокодазол, винбластин или винкристин), вызывает стабилизацию полимерных микротрубочек (Kumar, 1981; Dumontet, Sikic, 1999). Обработка кожи лягушки таксолом также оказывает существенное ингибирующее влияние на транспорт Na^+ и активность ENaC (Мельницкая и др., 2005).

Молекулярные механизмы, опосредующие регуляторное влияние микротрубочек на Na^+ -каналы, неясны. Известно, что микротрубочки играют важную роль в регуляции плотности ENaC в апикальной мембране, особенно в осуществлении процессов встраивания ENaC (экзоцитоза). Нарушение структуры микротрубочек антимитотическими агентами, такими как колхицин, колцемид и нокодазол, снижает стимулирующее влияние различных гормонов (альдостерона и вазопрессина) на транспорт Na^+ путем ингибирования секреции белков и встраивания каналов в апикальную мембрану. Подобное влияние антимитотических агентов на транспорт Na^+ показано для различных типов осморегулирующих эпителиев, в том числе для клеточной линии A6 (Parisi et al., 1985; Verrey et al., 1995), линии MDCK (Parczyk et al., 1989) и эпителия мочевого пузыря амфибий (Marples et al., 1996).

Имеются данные о том, что микротрубочки (наравне с элементами актинового цитоскелета) участвуют в процессах эндоцитоза (Verrey et al., 1995; Brown, Stow, 1996; Hamm-Alvarez, Sheetz, 1998). Наиболее вероятно, что микротрубочки вовлечены преимущественно в процесс сортировки и регуляции движения уже интернализированных везикул, а не в процесс формирования эндоцитозных везикул. Предполагают также, что при блокировании везикулярного транспорта вдоль микротрубочек в одном направлении снижается транспорт везикул в противоположном направлении (Hamm-Alvarez, Sheetz, 1998).

Роль актинового цитоскелета. Показано, что актиновый цитоскелет участвует в регуляции активности

ENaC (Els, Chou, 1993; Cantiello, 1995; Berdiev et al., 1996; Rehn et al., 1998). Известно, что ENaC колокализуются с актиновыми филаментами и актинсвязывающими белками (анкирином и спектрином) (Cantiello et al., 1991; Smith et al., 1991). Кроме того, показано непосредственное взаимодействие между белками ENaC и SH_3 -домом α -спектрина благодаря наличию богатого пролином участка на С-терминальном конце α -субъединицы ENaC (Rotin et al., 1994).

Механизм, посредством которого микрофиламенты регулируют активность ENaC, неизвестен. Результаты многих экспериментов свидетельствуют о том, что в клетках A6 стимулирующим действием на ENaC обладают короткие актиновые филаменты, а не мономерный G-или фибриллярный F-актин (Cantiello et al., 1991; Berdiev et al., 1996). Формирование при помощи актинсвязывающих белков (филамина) сети поперечно сшитых микрофиламентов также ингибирует активность ENaC (Cantiello et al., 1991). Предполагают, что динамическое изменение в организации микрофиламентов (например, деполимеризация F-актина с образованием коротких актиновых филаментов) является одним из возможных механизмов модуляции актином активности ENaC (Cantiello et al., 1991; Prat et al., 1992). В пользу предположения о непосредственном влиянии микрофиламентов на активность ENaC свидетельствует наличие недавно обнаруженного участка связывания для актина на С-терминальном конце α -субъединицы ENaC клеток почки млекопитающих (аминокислоты 631—644); делеция этого участка приводит к изменению воротных характеристик канала (Copeland et al., 2001). В то же время микрофиламенты (непосредственно или через связанные с актином белки, например фодрин) могут вызывать изменения липидного микроокружения канала и тем самым модулировать активность ENaC (Cantiello et al., 1991, 1993; Prat et al., 1992). Опосредованное влияние актиновых филаментов на ENaC может осуществляться также путем регуляции микрофиламентами активности многих сигнальных молекул в клетке (Cantiello et al., 1993; Janmey, 1998).

Кроме того, наблюдаются существенные различия между клетками по влиянию архитектуры актинового цитоскелета на активность ENaC. Так, фармакологические агенты, разрушающие F-актин (например, цитохалазины), в клетках A6 вызывают стимуляцию транспорта Na^+ (Cantiello et al., 1991; Prat et al., 1992; Rehn et al., 1998). А в коже и мочевом пузыре амфибий разрушение микрофиламентов под действием цитохалазинов или латрункулина В приводит к ингибированию транспорта Na^+ и сопровождается снижением трансэпителиального потенциала (Pratley, McQuillen, 1973; Franki et al., 1992; Els, Chou, 1993; Chou, Els, 1995; Крутецкая и др., 2004; Pashina et al., 2004; Мельницкая, 2005). Наиболее вероятно, что подобные различия во влиянии реорганизации актиновых филаментов на свойства ENaC у разных типов эпителиальных клеток связаны с их специализацией и свидетельствуют о существовании тесной взаимосвязи структурно-функциональной организации актинового цитоскелета со специализацией клетки.

Кроме того, фаллоидин — высокотоксичный алкалоид бледной поганки *Amanita phalloides*, стабилизирующей актиновые филаменты путем подавления их деполимеризации (Фултон, 1987; Cooper, 1987), также снижает транспорт Na^+ в коже лягушки (Крутецкая и др., 2004; Pashina et al., 2004). Таким образом, результаты наших экспериментов свидетельствуют о том, что любые изме-

нения в структуре (деполимеризация или стабилизация) микротрубочек и микрофиламентов приводят к ингибированию транспорта Na^+ в коже лягушки.

Регуляция активности ENaC альдостероном

Минералокортикоид альдостерон является основным гормоном, отвечающим за поддержание водного и солевого баланса у всех наземных позвоночных. В дистальных сегментах почки позвоночных, так же как и в эпителии кожи и мочевого пузыря амфибий, альдостерон стимулирует (ре)абсорбцию Na^+ и секрецию K^+ (Crabbé, 1961, 1972; Stockand, 2002).

Физиологический эффект альдостерона, как и всех стероидов, опосредуется экспрессией генов и синтезом белков *de novo*. Влияние альдостерона инициируется связыванием гормона с цитоплазматическими рецепторами. Выделяют два типа рецепторов для альдостерона — с высокой (рецептор I типа) и низкой (рецептор II типа) чувствительностью к гормону; у рецептора I типа константа диссоциации [Kd] равна примерно 1—2 нМ, у рецептора II типа — примерно 20—80 нМ (Rossier et al., 1985). Связывание с гормоном активирует рецептор и сообщает ему способность к взаимодействию с молекулой ДНК. В ядре взаимодействие между комплексом гормон—рецептор и ДНК индуцирует активацию или репрессию генов, белковые производные которых модифицируют функциональные характеристики клеток-мишеней для данного гормона.

Эксперименты с использованием в качестве модельных объектов эпителиальных тканей амфибий позволили выявить основные особенности индуцируемого альдостероном увеличения трансэпителиального транспорта Na^+ (Verrey, 1995). Так, регуляторное действие альдостерона, связанное с изменением активности генов, принято разделять на четыре различных периода, каждый из которых характеризуется различными клеточными событиями.

В течение первой фазы (начальный, или латентный, период — 0.5—1.0 ч) действия альдостерона происходит инициирование синтеза белков *de novo*, однако не наблюдается значительных изменений в интенсивности транспорта Na^+ . Вторая фаза, или ранний ответ (1.5—3.0 ч), характеризуется активацией преэкспрессированных субъединиц ENaC и Na^+/K^+ -АТФаз. В следующие 6—24 ч развивается поздний ответ, в течение которого наблюдается индукция вновь синтезированных белков ENaC и Na^+/K^+ -АТФаз. Заключительный этап, или «хроническое» увеличение трансэпителиального транспорта Na^+ , индуцируемое альдостероном, сохраняется в течение нескольких суток и сопровождается развитием дополнительных морфологических изменений (Wade et al., 1990).

Появляются данные, дополняющие традиционную модель действия стероидных гормонов. Так, влияние стероидных гормонов на активность генов может регулироваться непосредственным взаимодействием между молекулой гормона и ДНК (Hendry, 1988). Кроме того, некоторые эффекты стероидных гормонов осуществляются без изменения уровня экспрессии генов и реализуются путем взаимодействия гормонов с мембранными рецепторами (Wehling, 1997) или посредством белок-белковых взаимодействий между комплексом гормон—рецептор и белками-мишенями (McEwan et al., 1997).

В эпителии кожи и мочевого пузыря амфибий латентный период действия альдостерона составляет примерно 3 ч, по истечении которых развивается ранний ответ (45—90 мин), сопровождающийся двукратным увеличением транспорта Na^+ и существенным снижением трансэпителиального сопротивления. Последующие 12—24 ч характеризуются постепенным увеличением транспорта Na^+ , в течение этого времени трансэпителиальное сопротивление сохраняется стабильно низким (Crabbé, 1961, 1972). Известно, что увеличение транспорта Na^+ в различных эпителиальных тканях, в том числе в эпителии кожи и мочевого пузыря амфибий, реализующееся на позднем и хроническом этапах развития влияния альдостерона, является результатом синтеза *de novo* субъединиц ENaC и Na^+/K^+ -АТФаз (Garty, Palmer, 1997; Stockand, 2002). Особый интерес представляет тот факт, что в различных эпителиальных системах альдостерон по-разному стимулирует транскрипцию тех или иных субъединиц ENaC. Так, в клетках почки альдостерон увеличивает транскрипцию преимущественно α -субъединицы ENaC, тогда как в клетках кишечного эпителия альдостерон в большей степени стимулирует транскрипцию β - и γ -субъединиц ENaC (Snyder, 2005).

Несмотря на интенсивные исследования, молекулярные механизмы, обеспечивающие латентный и ранний периоды действия альдостерона в эпителиальных тканях, неизвестны. Показано, что в различных эпителиальных тканях альдостерон существенно усиливает стимулирующее влияние на транспорт Na^+ некоторых гормонов, например вазопрессина (Stoff et al., 1972) и инсулина (Fidelman, Watlington, 1984; Moller, Flier, 1991; Rodriguez-Commes et al., 1994). Полученные результаты свидетельствуют о том, что механизмы влияния этих гормонов на транспорт Na^+ частично перекрываются.

Наибольший прогресс достигнут в изучении альдостеронзависимых сигнальных каскадов, обуславливающих активацию гормоном преэкспрессированных ENaC и Na^+/K^+ -АТФаз в различных культурах клеток почки амфибий и млекопитающих (Stockand, 2002). Показано, что по крайней мере некоторые регуляторные белки, участвующие в регуляции альдостероном активности ENaC, такие как малые G-белки семейства Ras (Spindler et al., 1997; Mastroberardino et al., 1998; Staruschenko et al., 2004b), ФИ-3-киназа (Record et al., 1998; Blazer-Yost et al., 1999; Edinger et al., 1999; Păunescu et al., 2000) и Sgk-киназа (serum- and glucocorticoid-regulated kinase) (Parc et al., 1999; Stockand, 2002), являются мишенями не только для альдостерона, но и для других гормонов, регулирующих транспорт Na^+ в эпителиальных клетках. В эпителии кожи и мочевого пузыря амфибий, так же как и в большинстве реабсорбирующих эпителиальных тканей, повышение альдостероном Na^+ -проницаемости апикальной мембраны связано с увеличением активности ENaC (Crabbé, 1963; Stockand, 2002). Однако в настоящее время неизвестно, изменение каких именно характеристик ENaC обуславливает увеличение гормоном Na^+ -проницаемости апикальной мембраны в коже амфибий. Наиболее вероятно, что, как и в клетках А6, альдостерон вызывает многократное увеличение числа открытых каналов в мембране (Helman et al., 1998; Alvarez de la Rosa et al., 1999), сопровождающееся незначительным компенсаторным снижением вероятности открытого состояния ENaC (Helman et al., 1998).

Патология эпителиальных Na^+ -каналов

В клетках почки для поддержания постоянной внеклеточной концентрации Na^+ абсорбция Na^+ сопровождается осмотическим входом воды. Таким образом, абсорбция Na^+ приводит к увеличению объема плазмы и подъему кровяного давления. В связи с этим повышенная активность ENaC вызывает гипертонию, а пониженная активность — гипотонию. В последнее время показано, что мутации генов, кодирующих субъединицы ENaC, нарушающие структурно-функциональную организацию канала, приводят к ряду тяжелых наследственных заболеваний, таких как синдром Лиддла и псевдогипоальдостеронизм типа I (Ascroft, 2000; Kellenberger, Schild, 2002; Snyder, 2002).

Синдром Лиддла — это редкая форма наследственной гипертонии (Liddle et al., 1963). Синдром характеризуется очень высокой скоростью поступления Na^+ в клетки почки, несмотря на низкий уровень альдостерона (псевдогиперальдостеронизм). В результате пациенты страдают от сильной гипертонии, вторичной гипокалиемии и метаболического ацидоза. Заболевание корректируется трансплантацией почки (Botero-Velez et al., 1994). Для лечения гипертонии и гипокалиемии используются также блокаторы ENaC в сочетании с ограничением соли в рационе больных.

Синдром Лиддла вызывается мутациями генов, кодирующих белки β - или γ -субъединиц ENaC, что приводит к гиперактивности канала. Гены *SCNN1B* и *SCNN1G*, кодирующие β - и γ -субъединицы ENaC соответственно, расположены в соседних участках хромосомы 16p13—p12 (Voilley et al., 1995). Все мутации локализованы в области С-конца субъединиц. Происходят смысловые (миссенс) мутации в области РУ-домена (Pro618Leu, Тур620His в β -субъединице) (Hansson et al., 1995b), замены или делеции, которые приводят к введению новых стоп-кодонов и делеции С-конца субъединиц ENaC (Hansson et al., 1995a). Так, введение стоп-кодона при Arg564 приводит к делеции 75 из 85 аминокислот на С-конце (Snyder, 2002). Коэкспрессия в ооцитах *Xenopus* мутантной β -субъединицы с α - и γ -субъединицами дикого типа приводит к существенному (в 3—5 раз) увеличению амилорид-чувствительных Na^+ -токов (Schild et al., 1995, 1996). Увеличение Na^+ -тока наблюдается и при других мутациях, сопровождающих синдром Лиддла. Возрастание токов связано как с увеличением числа функционально активных каналов, так и с увеличением вероятности открытого состояния существующих каналов (Firsov et al., 1996). Проводимость одиночного канала, селективность и чувствительность к блокирующему действию амилорида при этом не изменяются. Исследования мутаций у семей, страдающих от синдрома Лиддла, выявило важную роль РУ-домена (PPPxY) в регуляции активности ENaC (Rotin et al., 1994; Shimkets et al., 1994). Ключевую роль играет тирозин, так как мутация Тур618Ala увеличивает Na^+ -токи в той же степени, что и удаление всего С-конца (Snyder et al., 1995). Мутации трех пролинов (Pro614Ala, Pro615Ala и Pro616Ala) в РУ-доме также приводят к увеличению Na^+ -токов (Snyder, 2002). Возрастание токов частично связано с тем, что укорочение С-конца приводит к увеличению содержания белка канала в мембране. Это, по-видимому, объясняется невозможностью удалить укороченный ENaC из мембраны, так как делеция РУ-домена препятствует взаимодействию канала с белками, такими как Nedd 4.

Псевдогипоальдостеронизм типа I (РНА-1) — это редкое наследственное заболевание, при котором почка не реагирует на альдостерон (Cheek, Perry, 1957). Характеризуется гипотонией и дегидратацией у новорожденных и детей. У пациентов наблюдаются также высокая концентрация ионов K^+ в плазме крови и метаболический ацидоз, несмотря на высокий уровень альдостерона. При заболевании поражаются не только почки, ни и толстая кишка и потовые железы, в которых происходит потеря солей. Пациентов обычно лечат введением солей.

РНА-1 возникает за счет мутаций в α -, β - и γ -субъединицах ENaC. Субъединица α ENaC кодируется геном *SCNN1A*, который локализован на хромосоме 12p13 (Voilley et al., 1994). Происходят как мутации со сдвигом рамки (frameshift mutations), которые вызывают терминацию трансляции, так и смысловые мутации (Chang et al., 1996; Strautnieks et al., 1996a, 1996b). При всех мутациях значительно уменьшается активность ENaC, что приводит к уменьшению абсорбции Na^+ в почках. Это стимулирует секрецию ренина и альдостерона, однако реабсорбция соли не возрастает, так как ENaC не функционирует. Уменьшение входа Na^+ в клетках дистального канальца почки приводит к вторичному уменьшению секреции K^+ , обусловленному тем, что активность Na^+/K^+ -АТФазы нарушается из-за низкой внутриклеточной концентрации Na^+ . Этим и объясняется гиперкалиемия, наблюдающаяся при РНА-1.

Какие именно нарушения в структурно-функциональной организации ENaC вызывают РНА-1, неизвестно. Однако появляются данные о том, что некоторые из обнаруженных мутаций, вызывающих РНА-1, связаны с нарушением процесса доставки ENaC к клеточной поверхности (Snyder, 2002). Например, замена остатка цистеина (α Cys133Tyr), входящего в состав высококонсервативного цистеинового фрагмента экстраклеточной петли α -субъединицы ENaC, приводит к существенному снижению экспрессии каналов в мембране, но не влияет на сборку и деградацию субъединиц канала (Snyder, 2002).

Заключение

Транспорт Na^+ в осморегулирующих эпителиях представляет собой сложный многокомпонентный процесс, обеспечивающий создание и поддержание электролитического и водного гомеостаза.

Первый этап трансэпителиального транспорта Na^+ , т. е. вход Na^+ в клетку, обеспечивается при участии эпителиальных Na^+ -каналов (ENaC). ENaC являются представителями суперсемейства потенциалнезависимых Na^+ -каналов, блокируемых амилоридом, называемых Deg/ENaC (дегенерины/эпителиальные Na^+ -каналы). ENaC играют ведущую роль в осуществлении направленного переноса Na^+ . Структурные нарушения в результате мутаций их генов приводят к гипер- или гипотонии и лежат в основе ряда наследственных заболеваний.

Анализ данных литературы свидетельствует о существенном прогрессе в понимании структуры ENaC и их топологии в мембране. В то же время механизмы регуляции избирательного транспорта Na^+ и роль в этом процессе ключевых молекул внутриклеточной передачи сигнала остаются во многом неясными. Регуляция активности ENaC осуществляется при участии аденилатциклаз-

ного и фосфоинозитидного путей передачи сигнала, метаболитов цикла арахидоновой кислоты, элементов цитоскелета, а также тирозинкиназ и тирозинфосфатаз. Регуляторное действие большинства гормонов и фармакологических агентов на ENaC осуществляется при участии не одной, а сразу нескольких сигнальных систем. Взаимосвязь и взаимовлияние различных путей передачи сигнала в регуляции транспорта Na^+ и активности ENaC в эпителиальных клетках интенсивно изучаются и являются основным направлением работ в этой области в последние годы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 03-04-49091) и Министерства образования РФ (проект 4681).

Список литературы

- Крутецкая З. И., Лебедев О. Е. 2000. Структурно-функциональная организация сигнальных систем в клетках. Цитология. 42 (9) : 844—874.
- Крутецкая З. И., Лебедев О. Е. 1998. Роль тирозинового фосфорилирования в регуляции активности ионных каналов клеточных мембран. СПб.: Айю. 244 с.
- Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Курилова Л. С. 2003а. Механизмы внутриклеточной сигнализации. СПб.: Изд-во СПбГУ. 208 с.
- Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Пашина (Мельницкая) А. В. 2003б. Роль фосфоинозитидов в регуляции транспорта Na^+ в коже лягушки. В кн.: Рецепция и внутриклеточная сигнализация. Пушино. 80—82.
- Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Пашина (Мельницкая) А. В. 2003в. Роль протеинкиназы С в регуляции трансэпителиального транспорта Na^+ в коже взрослых особей и головастиков лягушки *Rana temporaria*. Цитология. 45 (6) : 590—595.
- Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Пашина (Мельницкая) А. В. 2004. Роль актинового цитоскелета в регуляции транспорта Na^+ в коже лягушки. В кн.: Матер. III съезда биофизиков России. Воронеж. 1 : 239—240.
- Мельницкая А. В. 2005. Влияние деполимеризатора актиновых микрофиламентов — лагрункулина В на транспорт Na^+ в коже лягушки *Rana temporaria*. Вестн. молодых ученых. СПб.: Изд-во СПбГУТД. 75.
- Мельницкая А. В., Крутецкая З. И., Лебедев О. Е. 2005. Влияние стабилизатора микротрубочек таксола на транспорт Na^+ в коже лягушки. Бюл. сиб. мед. Томск: Наука. 4 (1) : 116.
- Наточин Ю. В., Чапек К. 1976. Методы исследования транспорта ионов и воды. Л.: Наука. 220 с.
- Пашина (Мельницкая) А. В. 2004. Ингибитор фосфоинозитидкиназ вертманнин снижает стимулирующее влияние инсулина на транспорт Na^+ в коже лягушки. В кн.: Человек и его здоровье. СПб.: Изд-во СПбГЭТУ. 212—213.
- Пашина (Мельницкая) А. В., Крутецкая З. И., Лебедев О. Е. 2002. Влияние активаторов и ингибиторов протеинкиназы С на трансэпителиальный транспорт Na^+ в коже лягушки. В кн.: Человек и его здоровье. СПб.: Изд-во НИИХ СПбГУ. 192—193.
- Пашина (Мельницкая) А. В., Крутецкая З. И., Лебедев О. Е. 2003. Роль микротрубочек в регуляции трансэпителиального транспорта Na^+ в коже лягушки *Rana temporaria*. В кн.: Человек и его здоровье. СПб.: Изд-во СПбГЭТУ. 129—130.
- Пашина (Мельницкая) А. В., Крутецкая З. И., Лебедев О. Е. 2004. Влияние инсулина на транспорт Na^+ в коже лягушки. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 90 (8) : 68.
- Фултон А. 1987. Цитоскелет. Архитектура и хореография клетки. М.: Мир. 117 с.
- Adams C. M., Anderson M. G., Motto D. G., Price M. P., Johnson W. A., Wolsh M. J. 1998. Ripped pocket and pickpocket, novel *Drosophila* Deg/ENaC subunits expressed in early development and in mechanosensory neurons. J. Cell Biol. 140 : 143—152.
- Alvarez de la Rosa D. A., Li H., Canessa C. M. 1999. Effect of aldosterone on biosynthesis, traffic, and functional expression of epithelial sodium channel in A6 cells. J. Gen. Physiol. 119 : 427—442.
- Andersen H., Bjerregaard H., Nielsen R. 1990. Effect of 12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate on solute transport and production of cAMP in isolated frog skin. Acta physiol. scand. 140 : 199—208.
- Ashcroft F. M. 2000. Ion channels and disease. San Diego, California: Acad. Press. 481 p.
- Ashended C. L., Staller J. M., Boutwell R. K. 1983. Protein kinase activity associated with a phorbol ester receptor purified from mouse brain. Cancer. Res. 43 : 4333—4337.
- Awayda M. S. 2000. Specific and nonspecific effects of protein kinase C on the epithelial Na^+ channel. J. Gen. Physiol. 115 : 559—570.
- Awayda M. S., Platzer J. D., Reger R. L., Bengrine A. 2002. Role of PKC α in feedback regulation of Na^+ transport in an electrically tight epithelium. Amer. J. Physiol. 283 : C1122—C1132.
- Axelrod J. 1990. Receptor-mediated activation of phospholipase A2 and arachidonic acid release in signal transduction. Biochem. Soc. Trans. 18 : 503—507.
- Barry E., Hall W. J. 1969. Stimulation of sodium movement across frog skin by prostaglandin E_1 . J. Physiol. 200 : 83—84.
- Baxendall L. M. 1988. Insulin increases apical sodium density in A6 epithelia. FASEB J. 2 : A748.
- Benos D. J., Awayda M. S., Ismailov I. I., Johnson J. P. 1995. Structure and function of amiloride-sensitive Na^+ channels. J. Membr. Biol. 143 : 1—18.
- Benos D. J., Fuller C. M., Shlyonsky V. G., Berdiev B. K., Ismailov I. I. 1997. Amiloride-sensitive Na^+ channels: insights and outlooks. News Physiol. Sci. 12 : 55—61.
- Benos D. J., Stanton B. A. 1999. Functional domains within the degenerin/epithelial sodium channel (Deg/ENaC) superfamily of ion channels. J. Physiol. 520 : 631—644.
- Bentley P. J. 1968. Amiloride: a potent inhibitor of sodium transport across the toad bladder. J. Physiol. Lond. 195 : 317—333.
- Berdiev B. K., Prat A. G., Cantiello H., Ausiello D., Fuller C. M., Jovov B., Benos D. J., Ismailov I. 1996. Regulation of epithelial sodium channels by short actin filaments. J. Biol. Chem. 271 : 17 704—17 710.
- Berridge M. J. 1993. Inositol trisphosphate and calcium signaling. Nature. 361 : 315—325.
- Bevan S., Wood J. N. 1987. Arachidonic acid metabolites as second messenger. Nature. 328 : 20.
- Bjerregaard H. F., Nielsen R. 1990. Role of Ca^{2+} and prostaglandins in regulation of active Na^+ transport in frog skin. Comp. Biochem. Physiol. 97 : 75—80.
- Blazer-Yost B. L., Esterman M., Vlahos C. J. 2003. Insulin-stimulated trafficking of ENaC in renal cells requires PI3-kinase activity. Amer. J. Physiol. 284 : C1645—C1653.
- Blazer-Yost B. L., Liu X., Helman S. I. 1996. Insulin stimulated Na^+ transport is mediated by increase of apical Na^+ channels and not open probability in control and aldosterone prestimulated A6 epithelia. FASEB J. 10 : A78.
- Blazer-Yost B. L., Liu X., Helman S. I. 1998. Hormonal regulation of ENaCs: insulin and aldosterone. Amer. J. Physiol. 274 : C1373—C1379.
- Blazer-Yost B. L., Păunescu T. G., Helman S. I., Lee K. D., Vlahos C. J. 1999. Phosphoinositide 3-kinase is required for aldosterone-regulated sodium reabsorption. Amer. J. Physiol. 277 : C531—C536.
- Blazer-Yost B. L., Vahle J. C., Byars J. M., Bacallao R. L. 2004. Real-time three-dimensional imaging of lipid signal transduction: apical membrane insertion of epithelial Na^+ channels. Amer. J. Physiol. 287 : C1569—C1576.
- Botero-Velez M., Curtis J. J., Warnock D. G. 1994. Brief Report: Little's syndrome revisited — a disorder of sodium reabsorption in the distal tubule. New Engl. J. Med. 330 : 178—181.

- Breyer M. T., Breyer R. M. 2000. Prostaglandin E receptors and the kidney. *Amer. J. Physiol.* 279 : F12—F23.
- Brodin B., Rytved K. A., Nielsen R. 1996. An increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ activates basolateral chloride channels and inhibits apical sodium channels in frog skin epithelium. *Pflügers Arch.* 433 : 16—25.
- Brown D., Stow J. 1996. Protein trafficking and polarity in kidney epithelium: from cell biology to physiology. *Physiol. Rev.* 76 : 245—297.
- Butterwort M. B., Edinger R. S., Johnson J. P., Frizzell A. 2004. Acute ENaC stimulation by camp in a kidney cell line is mediated by exocytic insertion from a recycling channels pool. *J. Gen. Physiol.* 125 : 81—101.
- Cadena D. L., Gill G. N. 1992. Receptor tyrosine kinases. *FASEB J.* 6 : 2332—2337.
- Canessa C. M., Merillat A.-M., Rossier B. C. 1994a. Membrane topology of the epithelial sodium channel in intact cells. *Amer. J. Physiol.* 267 : C1682—C1690.
- Canessa C. M., Schild L., Buell G., Thorens B., Gautschi I., Horisberger J. D., Rossier B. C. 1994b. Amilorid-sensitive epithelial sodium channel is made of three homologous subunits. *Nature.* 367 : 463—467.
- Cantiello H. F. 1995. Role of the actin cytoskeleton on epithelial Na^+ channel regulation. *Kidney International.* 48 : 970—984.
- Cantiello H. F., Patenaude C. R., Codina J., Birnbaumer L., Ausiello D. A. 1990. $G_{\alpha i-3}$ regulates epithelial Na^+ channels by activation of phospholipase A_2 and lipoxygenase pathways. *J. Biol. Chem.* 265 : 21 624—21 628.
- Cantiello H. F., Prat A. G., Bonventre J. V., Cun-Nigham C. C., Hartwig J. H., Ausiello D. 1993. Actin-binding protein contributes to cell volume regulatory ion channel activation in melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 268 : 4596—4599.
- Cantiello H. F., Stow J., Prat A. G., Ausiello D. 1991. Actin filaments control epithelial Na^+ channel activity. *Amer. J. Physiol.* 261 : C882—C888.
- Cantrell D. A. 2001. Phosphoinositide 3-kinase signaling pathways. *J. Cell Sci.* 114 : 1439—1445.
- Carattino M. D., Hill W. G., Kleyman T. R. 2003. Arachidonic acid regulates surface expression of epithelial sodium channels. *J. Biol. Chem.* 278 : 36 202—36 213.
- Castanga M., Takai Y., Kaibuchi K., Sano K., Kikkawa U., Nishizuka Y. 1982. Direct activation of calmodulin-activated, phospholipids-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol ester. *J. Biol. Chem.* 257 : 7847—7851.
- Chalfant M. L., Civan J. M., Peterson-Yantorno K., DiBona D. R., O'Brien T. G., Civan M. M. 1996. Regulation of epithelial Na^+ permeability by protein kinase C is tissue specific. *J. Membr. Biol.* 152 : 207—215.
- Chang S. S., Grunder S., Hanukoglu A., Rosler A., Mathew P. M., Hanukoglu I., Schild L., Lu Y., Shimkets R. A., Nelson-Williams C., Rossier B. C., Lifton R. P. 1996. Mutation in subunits of the epithelial sodium channel cause salt wasting with hyperkalaemic acidosis, pseudohypoaldosteronism type 1. *Nat. Genet.* 12 : 248—253.
- Cheek D. B., Perry J. W. 1957. A salt-wasting syndrome in infancy. *Arch. Dis. Child.* 33 : 252—256.
- Chou K. Y., Els W. J. 1995. Distribution of actin microfilaments in frog skin epithelial granular cells. *Biol. Cell.* 83 : 61—68.
- Chou K. Y., Els W. J. 1997. Effects of disassembly of actin microfilaments on the AVP-induced regulation of sodium channel densities in frog skin epithelium. *Biol. Cell.* 89 : 285—294.
- Civan M. M., Oleg A., Peterson-Yantorno K., George K., O'Brien T. G. 1991. A Ca^{2+} -independent form of protein kinase C regulate Na^+ transport across frog skin. *J. Membr. Biol.* 121 : 37—50.
- Civan M. M., Peterson-Yantorno K., George K., O'Brien T. G. 1998. Interactions of TPA and insulin on Na^+ transport across frog skin. *Amer. J. Physiol.* 256 : C569—C578.
- Civan M. M., Peterson-Yantorno K., O'Brien T. G. 1987. Diacylglycerols stimulate short circuit current across frog skin by increasing apical Na^+ permeability. *J. Membr. Biol.* 97 : 193—204.
- Civan M. M., Peterson-Yantorno K., O'Brien T. G. 1989. Insulin and phorbol ester stimulate conductive Na^+ transport through a common pathway. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 85 : 963—967.
- Civan M. M., Rubenstein D., Mauro T., O'Brien T. G. 1985. Effects of tumor promoters on sodium ion transport across frog skin. *Amer. J. Physiol.* 248 : C457—C465.
- Coleman R. A., Smith W. L., Narumiya S. 1994. International union of pharmacology classification of prostanoid receptor: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol. Rev.* 46 : 205—229.
- Cooper J. A. 1987. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J. Cell Biol.* 105 : 1473—1478.
- Copeland S. J., Berdiev B. K., Ji H.-L., Lockhart J., Parker S., Fuller C. M., Benos D. J. 2001. Region in the carboxy terminus of α -bENaC involved in gating and functional effect of actin. *Amer. J. Physiol.* 281 : C231—C240.
- Cox M., Singer I. 1977. Insulin-mediated Na^+ transport in the toad urinary bladder. *Amer. J. Physiol.* 232 : F270—F277.
- Crabbé J. 1961. Stimulation of active sodium transport by the isolated toad bladder with aldosterone *in vitro*. *J. Clin. Invest.* 40 : 2103—2110.
- Crabbé J. 1963. Effect of adrenocortical steroids on active sodium transport by the urinary bladder and ventral skin of amphibia. In: Hormones and kidney. London: Acad. Press. 75—81.
- Crabbé J. 1972. Hormonal influences on trans epithelial sodium transport: aldosterone vs. insulin. *J. Ster. Biochem.* 3 : 229—235.
- Davis M. J., Wu X., Nurkiewicz T. R., Kawasaki J., Gui P., Hill M. A., Wilson E. 2001. Regulation of ion channels by protein tyrosine phosphorylation. *Amer. J. Physiol.* 281 : H1835—H1862.
- Dumontet C., Sikic B. I. 1999. Mechanisms of action of and resistance to antitubulin agents: microtubule dynamics, drug transport, and cell death. *J. Clin. Oncol.* 17 : 1061—1070.
- Edinger R. S., Rokaw M. D., Johnson J. P. 1999. Vasopressin stimulates sodium transport in A6 cells via a phosphatidylinositolide 3-kinase-dependent pathway. *Amer. J. Physiol.* 277 : F575—F579.
- Els W. J., Chou K. Y. 1993. Sodium-dependent regulation of epithelial sodium channel densities in frog skin; a role for the cytoskeleton. *J. Physiol.* 462 : 447—464.
- Els W. J., Helman S. I. 1981. Vasopressin, theophylline, PGE₂, and indomethacin on active Na transport in frog skin: studies with microelectrodes. *Amer. J. Physiol.* 241 : F279—F288.
- Els W. J., Helman S. I. 1991. Activation of epithelial Na channels by hormonal and autoregulatory mechanisms of action. *J. Gen. Physiol.* 98 : 1197—1220.
- Els W. J., Helman S. I. 1998. Dual role of prostaglandins (PGE₂) in regulation of channel density and probability of epithelial Na^+ channels in frog skin (*R. pipiens*). *J. Membr. Biol.* 155 : 75—87.
- Els W. J., Liu X., Helman S. I. 1998. Differential effects of phorbol esters (PMA) on blocker-sensitive ENaCs of frog skin and A6 epithelium. *Amer. J. Physiol.* 275 : C120—C129.
- Els W. J., Mahlangu F. D. 1987. Micro-electrode studies on the effect of exogenous cyclic adenosine monophosphate on active sodium transport in frog skin. *J. Physiol.* 388 : 547—563.
- Erlj D., CeSmet P., Van Drissche W. 1994. Effect of insulin on area and Na^+ channel density of apical membrane of cultured toad kidney cells. *J. Physiol.* 481 : 533—541.
- Erlj D., Gersten L., Sterba G., Schoen H. F. 1986. Role of prostaglandin in the response of tight to Ca^{2+} ionophores. *Amer. J. Physiol.* 250 : C557—C564.
- Eskandari S., Snyder P. M., Kreman M., Zampighi G. A., Welsh M. J., Wright E. M. 1999. Number of subunits comprising the epithelial sodium channel. *J. Biol. Chem.* 274 : 27 281—27 286.
- Ewart H. S., Klip A. 1995. Hormonal regulation of the Na^+ - K^+ -ATPase: mechanism underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Amer. J. Physiol.* 269 : C295—C311.
- Farquhar M. G., Palade G. E. 1965. Cell junction in amphibian skin. *J. Cell Biol.* 26 : 263—291.
- Fassina G., Contessa A. R. 1967. Digitoxin and prostaglandin E_1 as inhibitors of catecholamine-stimulated lipolysis and their inte-

- reaction with Ca^{2+} in the process. *Biochem. Pharmacol.* 16 : 1447—1453.
- Férelle E., Doucet A.* 2001. Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiol. Rev.* 81 : 345—418.
- Fidelman M. L., Watlington C. O.* 1984. Insulin and aldosterone interaction on Na^+ and K^+ transport in cultured kidney cells (A6). *Endo.* 115 : 1171—1178.
- Firsov D., Gautschi I., Merrill A. M., Rossier B. C., Schild L.* 1998. The heterotetrameric architecture of the epithelial sodium channel (ENaC). *EMBO J.* 17 : 344—352.
- Firsov D., Robert-Nicoud M., Gruender S., Schild L., Rossier B. C.* 1999. Mutational analysis of cysteine-rich domain of the epithelium sodium channel (ENaC): identification of cysteines essential for channel expression at the cell surface. *J. Biol. Chem.* 274 : 2743—2749.
- Firsov D., Schild L., Gautschi I., Merrill A. M., Schneeberger E., Rossier B. C.* 1996. Cell surface expression of the epithelial Na^+ channel and a mutant causing Liddle syndrome: a quantitative approach. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 93 : 15 370—15 375.
- Fisher E. H., Charbonneau H., Tonks N. K.* 1991. Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzyme. *Science.* 253 : 401—406.
- Forbush B. I., Kaplan J. H., Hoffman J. E.* 1978. Characterization of a new photoaffinity derivative of ouabain: labelling of the large polypeptide and of a proteolipid component of the Na,K-ATPase . *Biochemistry.* 17 : 3667—3676.
- Foster F. M., Traer C. J., Abraham S. M., Fry M. J.* 2003. The phosphoinositide (PI) 3-kinase family. *J. Cell Sci.* 116 : 3037—3040.
- Franki N., Ding G., Gao Y., Hays R. M.* 1992. Effect of cytochalasin D on the actin cytoskeleton of the toad bladder epithelial cell. *Amer. J. Physiol.* 263 : C995—C1000.
- Frindt G., Lee C. O., Yang J. M., Windhager E. E.* 1988. Potential role of cytoplasmic calcium ions in the regulation of sodium transport in renal tubules. *Miner. Electrolyte Metab.* 14 : 40—47.
- Gao Y., Franki N., Macaluso F., Hays R. M.* 1992. Vasopressin decreases immunogold labeling of apical actin in the toad bladder granular cell. *Amer. J. Physiol.* 263 : C908—C912.
- Garty H., Palmer L. G.* 1997. Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol. Rev.* 77 : 359—396.
- Gerencser G. A.* 1993. Effect of prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ on transmural potential difference and short-circuit current in isolated frog skin. *Comp. Biochem. Physiol.* 104 : 103—106.
- Goldman M. J., Anderson G. M., Stolzenberg E. D., Kari U. P., Zasloff M., Wilson J. M.* 1997. Human β -defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell.* 88 : 553—560.
- Grinstein S., Erlj D.* 1978. Intracellular calcium and the regulation of sodium transport in the frog skin. *Proc. R. Soc. Lond.* 202 : 353—360.
- Guo P., Hillyard S. D., Fu B. M.* 2003. A two-barrier compartment model flow across amphibian skin. *Amer. J. Physiol.* 285 : R1384—R1394.
- Hagiwara N., Tohda H., Doi Y., O'Brodivich H., Marunaca Y.* 1992. Effect of insulin and tyrosine kinase inhibitor on ion transport in the alveolar cell of the fetal lung. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187 : 802—808.
- Hamm-Alvares S., Sheetz M.* 1998. Microtubule-dependent transport: modulate of channel and transporter activity in liver and kidney. *Physiol. Rev.* 78 : 1109—1129.
- Hanks S. K., Hunter T.* 1995. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9 : 576—596.
- Hansson J. H., Nelson-Williams C., Suzuki H., Schild L., Shimkets R. A., Lu Y., Canessa C. M., Iwasaki T., Rossier B. C., Lifton R. P.* 1995a. Hypertension caused by a truncated epithelial sodium channel γ subunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome. *Nat. Genet.* 11 : 76—82.
- Hansson J. H., Schild L., Lu Y., Wilson T. A., Gautschi I., Shimkets R. A., Nelson-Williams C., Rossier B. C., Lifton R. P.* 1995b. A *de novo* missense mutation of the β subunit of the epithelial sodium channel causes hypertension and Liddle syndrome identifying a proline-rich segment critical for regulation of channel activity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 92 : 11 495—11 499.
- Hays R. M., Lindberg U.* 1991. Actin depolymerization in the cyclic AMP-stimulated toad bladder epithelial cells, determined by the DNase method. *FEBS Lett.* 280 : 397—399.
- Helman S. I., Cox T. C., Van Driessche W.* 1983. Hormonal control of apical membrane Na transport in epithelia. Studies with fluctuation analysis. *J. Gen. Physiol.* 82 : 201—220.
- Helman S. I., Liu X., Baldwin K., Blazer-Yost B. L., Els W. J.* 1998. Time-dependent stimulation by aldosterone of blocker-sensitive ENaC in A6 epithelia. *Amer. J. Physiol.* 274 : C947—C957.
- Helms M. N., Liu L., Liang Y.-Y., Al-Khalili O., Vandewalle A., Saxena S., Eaton D. C., Ma H.-P.* 2005. Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate mediates aldosterone stimulation of epithelial sodium channel (ENaC) and interacts with γ -ENaC. *J. Biol. Chem.* 280 : 40 885—40 891.
- Hendry L. B.* 1988. Stereochemical complementarity of steroid agonists and antagonists. *J. Steroid Biochem.* 31 : 439—523.
- Herrera F. C.* 1965. Effect of insulin on short-circuit current and sodium transport across toad urinary bladder. *Amer. J. Physiol.* 209 : 819—824.
- Hilgemann D. W., Ball R.* 1996. Regulation of cardiac Na^+ , Ca^{2+} exchange and K_{ATP} potassium channels by PIP_2 . *Science.* 273 : 956—959.
- Holt W. F., Lechene C.* 1981. ADH-PGE₂ interaction in cortical collecting tubule. I. Depression of sodium transport. *Amer. J. Physiol.* 241 : F452—F460.
- Huang M., Chalfe M.* 1994. Gene interaction affecting mechanosensory transduction in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 367 : 467—470.
- Hummeler E., Barker P., Gatzky J., Beermann F., Verdumo C., Schmidt A., Boucher R., Rossier B. C.* 1996. Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in ENaC-deficient mice. *Nat. Genet.* 12 : 325—328.
- Hunter T.* 1996. Tyrosine phosphorylation: past, present and future. *Biochem. Soc. Trans.* 24 : 307—327.
- Irvine R. F.* 1982. How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells? *Biochem. J.* 204 : 3—16.
- Ito O., Kondo Y., Takahashi N., Omata K., Abe K.* 1995. Role of calcium in insulin-stimulated NaCl transport in medullary thick ascending limb. *Amer. J. Physiol.* 269 : F236—F241.
- Jaisser F., Bugeon L., Blot-Chaubaud M., Bonvalet J. P., Farman N.* 1989. Effect of AVP and dDAVP on PGE₂ synthesis in superfused cortical collecting tubules. *Amer. J. Physiol.* 256 : F1044—F1050.
- Janmey P. A.* 1998. The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiol. Rev.* 78 : 763—781.
- Kazanietz M. G., Areces L. B., Bahador A., Mischak H., Goodnight J., Mushinski J. F., Blumberg P. M.* 1993. Characterization of ligand and substrate specificity for the calcium-dependent and calcium-independent protein kinase C isozymes. *Mol. Pharmacol.* 44 : 298—307.
- Kellenberger S., Auberson M., Gautschi I., Schneeberger E.* 2001. Permeability properties of ENaC selectivity filter mutants. *J. Gen. Physiol.* 118 : 679—692.
- Kellenberger S., Gautschi I., Schild L.* 2002. An external site controls closing of the epithelium Na^+ channel. *J. Physiol.* 543 : 413—424.
- Kellenberger S., Hoffmann-Pochon N., Gautschi I., Schneeberger E., Schild L.* 1999. On the molecular basis of ion permeation in the epithelial Na^+ channel. *J. Gen. Physiol.* 114 : 13—30.
- Kellenberger S., Schild L.* 2002. Epithelial sodium channel/De-generin family of ion channels: a variety of function for a shared structure. *Physiol. Rev.* 82 : 735—767.
- Kleyman T. R., Cragoe E. J.* 1988. Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. *J. Membr. Biol.* 105 : 1—21.
- Koefoed-Johnsen V., Ussing H. H.* 1958. The nature of the frog skin potential. *Acta physiol. scand.* 42 : 298—308.

- Kosari F., Sheng S., Li J., Mak D. O., Foskett J. K., Kleyman T. R. 1998. Subunit stoichiometry of the epithelial sodium channel. *J. Biol. Chem.* 273 : 13 469—13 474.
- Krahl M. E. 1974. Endocrine function of the pancreas. *Ann. Rev. Physiol.* 36 : 331—360.
- Krutetskaya Z. I., Lebedev O. E., Krutetskaya N. I., Pashina (Melnitskaya) A. V. 2002. Role of protein kinase C in Na⁺ transport regulation in frog skin. In: *New biocybernetic and telemedical technologies of the 21 century for disease diagnostics and patient treatment*. Petrozavodsk. 26.
- Ku N.-O., Zhou X., Toivola D. M., Omary M. B. 1999. The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease. *Amer. J. Physiol.* 277 : G1108—G1137.
- Kumar N. 1981. Taxol-induced polymerization of purified tubulin. *J. Biol. Chem.* 256 : 10 435—10 441.
- Kurashima K., Szabó E. Z., Lukacs G., Orlowski J., Grinstein S. 1998. Endosomal recycling of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 isoform is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 273 : 20 828—20 836.
- Lang F., Busch G. L., Ritter M., Völkl H., Waldegger S., Gulbins E., Häussinger D. 1998. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* 78 : 247—306.
- Liddle G. W., Bledsoe T., Coppade W. S. 1963. A familial renal disorder simulating primary aldosteronism but with negligible aldosterone secretion. *Trans. Assoc. Amer. Physicians.* 76 : 199—213.
- Ling B. N., Eaton D. C. 1989. Effect of luminal Na⁺ on single Na⁺ channels in A6 cells, a regulatory role for protein kinase. *C. Amer. J. Physiol.* 256 : F1094—F2003.
- Ma H. P., Saxena S., Warnock D. G. 2002. Anionic phospholipids regulate native and expressed epithelial sodium channel. *J. Biol. Chem.* 277 : 7641—7644.
- Mall M., Grubb B. R., Harkema J. R., O'Neal W. K., Boucher R. C. 2004. Increased airway epithelial Na⁺ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nat. Med.* 10 : 487—493.
- Mandon B., Siga E., Chabardes D., Firsov D., Roinel N., De Rouffignac C. 1993. Insulin stimulates Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺, and Mg²⁺ transports in TAL of mouse nephron: cross-potentialiation with AVP. *Amer. J. Physiol.* 265 : F361—F369.
- Mano I., Driscoll M. 1999. DEG/ENaC channels: a touchy superfamily that watches its salt. *Bioessays.* 21 : 568—578.
- Markadieu N., Blero D., Boom A., Erneux C., Beauwens R. 2004. Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate: an early mediator of insulin-stimulated sodium transport in A6 cells. *Amer. J. Physiol.* 287 : F319—F328.
- Marples D., Barber B., Taylor A. 1996. Effect of a dynein inhibitor on vasopressin action in toad urinary bladder. *J. Physiol.* 490 : 767—774.
- Marunaka Y., Eaton D. C. 1991. Effects of vasopressin and cAMP on single amilorid-blockable Na⁺ channels. *Amer. J. Physiol.* 260 : C1071—C1084.
- Marunaka Y., Hagiwara Y. N., Tohda H. 1992. Insulin activates amilorid blockable Na⁺ channels in a distal nephron cell line (A6) and mechanical coupling. *Physiol. Rev.* 78 : 763—781.
- Mastroberardino L., Spindler B., Forster I., Loffing J., Assandri R., May A., Verrey F. 1998. Ras pathway activates epithelial Na⁺ channel and decreases its surface expression on *Xenopus* oocytes. *Mol. Biol. Cell.* 9 : 3417—3427.
- Matsumoto P. S., Ohara A., Duchatelle P., Eaton D. C. 1993. Tyrosine kinase regulates epithelia sodium transport in A6 cells. *Amer. J. Physiol.* 264 : C246—C250.
- Mauro T., O'Brien T. G., Civan M. M. 1987. Effects of TPA on the short-circuit current across frog skin. *Amer. J. Physiol.* 252 : C173—C178.
- McEwan I. L., Wright A. P. H., Gustafsson J. A. 1997. Mechanism of gene expression by the glucocorticoid receptor: role of protein-protein interactions. *Bioessays.* 19 : 153—160.
- McIntosh T. J., Kulkarni K. G., Simon S. A. 1999. Membrane fusion promoters and inhibitors have contrasting effects on lipid bilayers structure and indulation. *Biophys. J.* 76 : 2090—2098.
- Melnitskaya A. V., Krutetskaya Z. I., Lebedev O. E. 2005. Actin filament disrupter latrunculin B modulates the effect of wortmannin on Na⁺ transport in frog skin. In: *Receptor and intracellular signaling*. Puschino. 94—97.
- Mies F., Shlyonsky V., Goodlaerts A., Sariban-Sohraby S. 2004. Modulation of epithelial Na⁺ channel activity by long-chain n-3 fatty acids. *Amer. J. Physiol.* 287 : F850—F855.
- Moller D. E., Flier J. S. 1991. Insuline resistance-mechanisms, syndromes, and implications. *N. Engl. J. Med.* 325 : 938—948.
- Morel A., O'Carroll A. M., Brownstein M. J., Lolait S. J. 1992. Molecular cloning and expression of a rat V1a arginine vasopressin receptor. *Nature.* 356 : 523—526.
- Morris R., Tousson A., Benos D. J., Schafer J. A. 1995. Microtubule disruption does not prevent vasotocin activation of Na⁺ channels (abstract). *J. Amer. Soc. Nephrol.* 6 : 347.
- Nagel W. 1978. Effect of antidiuretic hormone upon electrical potential and resistance of apical and basolateral membranes of frog skin. *J. Membr. Biol.* 42 : 99—122.
- Nagel W. 1985. Basolateral membrane ionic conductance in frog skin. *Pflügers Arch.* 405 : S39—S43.
- Newton A. C. 1995. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem.* 270 : 28 495—28 498.
- Niisato N., Van Driessche W., Liu M., Marunaka Y. 2000. Involvement of protein tyrosine kinase in osmoregulation of Na transport and membrane capacitance in renal A6 cells. *J. Membr. Biol.* 175 : 63—77.
- Nishizuka Y. 1995. Protein kinase 5: protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* 9 : 484—496.
- O'Brodovich H. 2001. Fetal lung liquid secretion: insights using the tolls of inhibitors and genetic knock-out experiments. *Amer. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 25 : 8—10.
- Oh Y., Smith P. R., Bradford A. L., Keeton D., Benos D. J. 1993. Regulation by phosphorylation of purified epithelial Na⁺ channels in planar lipid bilayers. *Amer. J. Physiol.* 265 : C85—C91.
- Ordway R. W., Singer J. J., Walsh J. V., Jr. 1991. Direct regulation of ion channels by fatty acids. *Trends Neurosci.* 14 : 96—100.
- Orloff J., Handler J. S. 1962. The similarity of effects of vasopressin, adenosine-3',5'-phosphate (cyclic AMP) and theophylline on the toad bladder. *J. Clin. Invest.* 41 : 702—709.
- Palmer L. G., Frindt G. 1996. Gating of Na⁺ channels in the rat cortical collecting tubule: effect of voltage and membrane stretch. *J. Gen. Physiol.* 107 : 35—45.
- Palmer L. G., Frindt G. 1987. Effect of cell Ca²⁺ and pH on Na⁺ channels from rat cortical collecting tubule. *Amer. J. Physiol.* 253 : F333—F339.
- Parc J., Leong M. L., Buse P., Maiyar A. C., Firestone G. L., Hemmings B. A. 1999. Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway. *EMBO J.* 18 : 3024—3033.
- Parczyk K., Haase W., Kondor-Koch C. 1989. Microtubules are involved in the secretion of proteins at the apical cell surface of the polarized epithelial cell (MDCK). *J. Biol. Chem.* 264 : 16 837—16 846.
- Parisi M., Pisam M., Merot J., Chevalier J., Bourguet J. 1985. The role of microtubules and microfilaments in the hydroosmotic response to antidiuretic hormone. *Biochim. biophys. acta.* 817 : 333—342.
- Pashina (Melnitskaya) A. V., Krutetskaya Z. I., Lebedev O. E. 2004. Role of the cytoskeleton in Na⁺ transport regulation in frog skin. In: *Biological motility*. Puschino. 53—54.
- Păunescu T. G., Blazer-Yost B. L., Vlahos C. L., Helman S. I. 2000. LY-294002-inhibitable PI 3-kinase and regulation of baseline rates of Na⁺ transport in A6 epithelia. *Amer. J. Physiol.* 279 : C236—C247.
- Pochynyuk O., Staruschenko A., Tong Q., Medina J., Stokand J. D. 2005. Identification of a functional phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate binding site in the epithelia Na⁺ channel. *J. Biol. Chem.* 280 : 37 565—37 571.
- Prat A. G., Ausiello D., Cantello H. 1992. Vasopressin and protein kinase A activate G protein-sensitive epithelial Na⁺ channels. *Amer. J. Physiol.* 265 : C218—C223.

- Pratley J. N., McQuillen N. K. 1973. The role of microfilaments in frog skin ion transport. *J. Cell Biol.* 56 : 850—857.
- Price M. P., Snyder P. M., Welsh M. J. 1996. Cloning and expression of a novel human brain Na⁺ channel. *J. Biol. Chem.* 271 : 7879—7882.
- Price M. P., Welsh M. J. 1999. Effect of subunit composition and Liddle's syndrome mutations on biosynthesis of ENaC. *J. Gen. Physiol.* 276 : C1346—C1351.
- Rameh L. E., Cantley L. D. 1999. The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J. Biol. Chem.* 274 : 8347—8350.
- Record R. D., Froelich L. L., Vlahos C. J., Blazer-Yost B. L. 1998. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin-stimulated sodium transport in A6 cells. *Amer. J. Physiol.* 274 : E611—E617.
- Rehn M., Weber W.-M., Clauss W. 1998. Role of the cytoskeleton in stimulation of Na⁺ channels in A6 cells by changes in osmolality. *Eur. J. Physiol.* 436 : 270—279.
- Rief M. C., Troutman S. L., Shafer J. A. 1986. Sodium transport by rat cortical collecting tubule. Effect of vasopressin and deoxycorticosterone. *J. Clin. Invest.* 77 : 1291—1298.
- Robert-Nicoud M., Flahaut M., Elalouf J. M., Nicod M., Salinas M., Bens M., Douset A., Wincker P., Artiguenane F., Horisberger J. D. 2001. Transcription of a mouse kidney cortical collecting duct cell line: effect of aldosterone and vasopressin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 98 : 2712—2716.
- Rodriguez-Commes J., Isales C., Kalghati L., Gasalla-Herraziz J., Hayslett J. P. 1994. Mechanism of insulin-stimulated electrogenic sodium transport. *Kidney International.* 46 : 666—674.
- Rohács T., Lopes C. M. B., Jin T., Ramdya P. P., Molnar Z., Logothetis D. E. 2003. Specificity of activation by phosphoinositides determines lipid regulation of Kir channels. *PNAS.* 100 : 745—750.
- Rokaw M. D., West M., Johnson J. P. 1996. Rapamycin inhibits protein kinase C activity and stimulates Na⁺ transport in A6 cells. *J. Biol. Chem.* 271 : 32 468—32 473.
- Rossier B. C., Geering K., Atkinson J., Roch-Ramel F. 1985. Renal receptors. In: *The kidney: physiology and pathophysiology*. New York: Raven Press. 775—806.
- Rotin D. D., Bar-Sagi D., O'Brodivich H., Merilainen J., Lehto V. P., Canessa C. M., Rossier B. C., Downey G. P. 1994. An SH₃ binding region in the epithelial Na⁺ channel (αENaC) mediated localization at the apical membrane. *EMBO J.* 13 : 4440—4450.
- Rouch A. J., Chen L., Kudo L. H., Bell P. D., Fowler B. C., Corbitt B. D., Schafer J. A. 1993. Intracellular Ca²⁺ and PKC activation do not inhibit Na⁺ and water transport in rat CCD. *Amer. J. Physiol.* 265 : F569—F577.
- Rytved K. A., Brodin B., Nielsen R. 1995. Prostaglandin E₂ release from dermis regulates sodium permeability of frog skin epithelium. *Acta physiol. scand.* 153 : 263—270.
- Rytved K. A., Brodin B., Nielsen R. 1996. Outward rectifying chloride channels in the basolateral membrane of frog skin epithelium. A patch clamp study. *Acta physiol. scand.* 153 : 263—270.
- Saltiel A. R. 1996. Diverse signaling pathways in the cellular actions of insulin. *Amer. J. Physiol.* 270 : E375—E385.
- Sato H., Endou H. 1990. Inhibitory effect of phorbol ester on sodium transport in frog urinary bladder. *Amer. J. Physiol.* 259 : F425—F431.
- Schild L., Canessa C. M., Shimkets R. A., Gautschi I., Lifton R. P., Rossier B. C. 1995. A mutation in the epithelial sodium channel Liddle disease increases channel activity in the *Xenopus laevis* oocyte expression system. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 92 : 5699—5703.
- Schild L., Lu Y., Gautschi I., Schneeberger E., Lifton R. P., Rossier B. C. 1996. Identification of a PY motif in the epithelial Na⁺ channel subunits as a target sequence for mutations causing channel activation found in Liddle syndrome. *EMBO J.* 15 : 2381—2387.
- Schild L., Schneeberger E., Gautschi I., Firsov D. 1997. Identification of amino acid residues in the α, β, γ subunits of the epithelial sodium channel (ENaC) involved in amiloride block and ion permeation. *J. Gen. Physiol.* 109 : 15—26.
- Schlessinger J., Ullrich A. 1992. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron.* 9 : 383—391.
- Schlondorff D., Levine S. D. 1985. Inhibition of vasopressin-stimulated water flow in toad bladder by phorbol myristate acetate, dioctanoylglycerol, and RHC-80267: evidence for modulation of action vasopressin by protein kinase C. *J. Clin. Invest.* 76 : 1071—1078.
- Schlondorff D., Satriano J. A. 1985. Interaction of vasopressin, camp, and prostaglandins in toad urinary bladder. *Amer. J. Physiol.* 248 : F454—F458.
- Schoen H. F., Ertij D. 1987. Insulin action on electrophysiological properties of apical and basolateral membranes of frog skin. *Amer. J. Physiol.* 252 : C411—C417.
- Schroer T. A., Sheetz M. P. 1991. Two activators of microtubule-based vesicle transport. *J. Cell Biol.* 115 : 1309—1318.
- Schulze D., Krauter T., Fritzenschaft H., Soom M., Baukowitz T. 2003. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) modulation of ATP and pH sensitivity in Kir channels. *J. Biol. Chem.* 278 : 10 500—10 505.
- Sharkey N. A., Leach K. L., Blumberg P. M. 1984. Competitive inhibition by diacylglycerol of specific phorbol ester binding. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 81 : 607—610.
- Sheng S., Li J., McNulty K. A., Avery D., Kleyman T. R. 2000. Characterization of the selectivity filter of the epithelial sodium channel. *J. Biol. Chem.* 275 : 8572—8581.
- Shepherd P. R., Nave B. T., O'Rahilly S. 1996. The role of phosphoinositide 3-kinase in insulin signaling. *J. Mol. Endocrinol.* 17 : 175—184.
- Shimkets R. A., Warnock D. G., Bositis C. M., Nelson-Williams C., Hansson J. H., Schammelan M., Gill J. R., Ulick S. Jr., Milora R. V., Finding J. W., Canessa C. M., Rossier B. C., Lifton R. P. 1994. Liddle's syndrome: heritable human hyoeryension caused by mutations in the β subunit of the epithelial sodium channel. *Cell.* 79 : 407—414.
- Silver R. B., Frindt G., Windhager E. E., Palmer L. G. 1993. Feedback regulation of Na⁺ channels in rat CCD. I. Effect of inhibitor of the Na pump. *Amer. J. Physiol.* 264 : F557—F564.
- Simon H., Gao Y., Franki N., Hays R. M. 1993. Vasopressin depolymerizes apical F-actin in rat inner medullary collecting duct. *Amer. J. Physiol.* 265 : C757—C762.
- Smith J. J., Travis S. M., Greenberg E. P., Welsh M. J. 1996. Cystic fibrosis airway epithelial fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell.* 85 : 229—236.
- Smith P. L., Montzka D. P., McCafferty G. P., Wasserman M. A., Fondacaro J. D. 1988. Effect of sulfidopeptide leukotrienes D₄ and E₄ on ileal ion transport *in vitro* in the rat and rabbit. *Amer. J. Physiol.* 255 : G175—G183.
- Smith P. R., Saccomani G., Joe E., Angelides K. J., Benos D. J. 1991. Amiloride-sensitive sodium channel is linked to the cytoskeleton in renal epithelia cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 88 : 6971—6975.
- Snyder P. M. 2002. The epithelial Na⁺ channel: cell surface insertion and retrieval in Na⁺ homeostasis and hypertension. *Endocrine Rev.* 23 : 258—275.
- Snyder P. M. 2005. Minireview: regulation of epithelial Na⁺ channel trafficking. *Endocrinology.* 146 : 5079—5085.
- Snyder P. M., Cheng C., Prince L. S., Rogers J. C., Welsh M. J. 1998. Electrophysiological and biochemical evidence that DEG/ENaC cation channels are composed of nine subunits. *J. Biol. Chem.* 273 : 681—684.
- Snyder P. M., Olson D. R., Bucher D. B. 1999. A pore segment in DEG/ENaC Na⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 274 : 28 484—28 490.
- Snyder P. M., Price M. P., McDonald F. J., Adams C. M., Volk K. A., Zeiher V. G., Stokes J. B., Welsh M. J. 1995. Mechanism by which Liddle's syndrome mutations increase activity of a human epithelial Na⁺ channel. *Cell.* 83 : 969—978.
- Sossin W. S., Schwartz J. H. 1993. Ca²⁺-independent protein kinase Cs contain an amino-terminal domain similar to the C2 consensus sequence. *Trends Biochem. Sci.* 18 : 207—208.
- Spindler B., Mastroberardino L., Custer M., Verrey F. 1997. Characterization of early aldosterone-induced RNAs identified in A6 kidney epithelia. *Pflügers Arch.* 434 : 323—331.

- Staruschenko A., Adams E., Booth R. E., Stockand J. D. 2005. Epithelial Na^+ channel subunit stoichiometry. *Biophys. J.* 88 : 3966—3975.
- Staruschenko A., Medina J. L., Patel P., Shapiro M. S., Booth R. E., Stockand J. D. 2004a. Fluorescence resonance energy transfer analysis of subunit stoichiometry of the epithelial Na^+ channel. *J. Biol. Chem.* 279 : 27 729—27 734.
- Staruschenko A., Patel P., Tong J. L. M., Stockand J. D. 2004b. Ras activates the epithelial Na^+ channel through phosphoinositide 3-OH kinase signaling. *J. Biol. Chem.* 279 : 37 771—37 778.
- Stockand J. D. 2002. New ideas about aldosterone signaling in epithelia. *Amer. J. Physiol.* 282 : F559—F576.
- Stockand J. D., Bao H. F., Schenck J., Malik B., Middleton P., Schanger L. E., Eaton D. C. 2000. Different effects of protein kinase C on the levels of epithelial Na^+ channel subunit proteins. *J. Biol. Chem.* 275 : 25 760—25 765.
- Stoff J. S., Handler J. S., Orloff J. 1972. The effect of aldosterone in the accumulation of adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate in toad bladder epithelial cells in response to vasopressin and theophylline. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 69 : 805—808.
- Strautnieks S. S., Thompson R. F., Gardiner R. M., Chung E. 1996a. A novel splice-site mutation on the gamma subunit of the epithelial sodium channel in three pseudohypoaldosteronism families. *Nat. Genet.* 13 : 248—250.
- Strautnieks S. S., Thompson R. F., Hanukoglu A., Dillon M. J., Hanukoglu I., Kuhnle U., Seckl J., Gardiner R. M., Chung E. 1996b. Localization of pseudohypoaldosteronism genes to chromosome 16p12.2-13.11 and 12p13.1-pter by homozygosity mapping. *Hum. Mol. Genet.* 5 : 293—299.
- Sunahara R. K., Taussing R. 2002. Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *J. Mol. Intervetn.* 2. 168—184.
- Szászi K., Paulsen A., Szabó E. Z., Numata M., Grinstein S., Orłowski J. 2002. Clatrin-mediated endocytosis and recycling of the neuron-specific Na^+/H^+ exchanger NHE5 isoform. *J. Biol. Chem.* 277 : 42 623—42 632.
- Taylor A., Windhager E. E. 1979. Possible role of cytosolic calcium and Na-Ca exchange in regulation of transepithelial sodium transport. *Amer. J. Physiol.* 236 : F505—F512.
- Tilly B. C., Van Den Berghe N., Tertoolen L. G., Edixhoven M. J., De Jonge H. R. 1993. Protein tyrosine phosphorylation is involved in osmoregulation of ionic conductances. *J. Biol. Chem.* 268 : 19 919—19 922.
- Toh H., Ichikawa A., Narumiya S. 1995. Molecular evolution of receptors for eicosanoids. *FEBS Lett.* 361 : 17—21.
- Tong Q., Gamper N., Medina J. L., Shapiro M., Stockand J. 2004. Direct activation of the epithelial Na^+ channel by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate produced by phosphoinositide 3-OH kinase. *J. Biol. Chem.* 279 : 22 654—22 663.
- Tong Q., Stockand J. 2005. Receptor tyrosine kinase mediate epithelial Na^+ channel inhibition by epidermal growth factor. *Amer. J. Physiol.* 288 : F150—F161.
- Uhrbach V., Van Kerkhove E., Harvey B. J. 1994. Inward-rectifier potassium channels in basolateral membranes of frog skin epithelium. *J. Gen. Physiol.* 103 : 583—604.
- Uhrbach V., Van Kerkhove E., Maguire D., Harvey B. J. 1996. Rapid activation of KATP channels by aldosterone in principal cells of frog skin. *J. Physiol.* 491 : 111—120.
- Ussing H. H., Windhager E. E. 1964. Active sodium transport at the cellular level. In: *Water and electrolytes metabolism. II.* Amsterdam: Elsevier. 3—19.
- Verrey F. 1995. Transcriptional control of sodium transport in tight epithelia by adrenal steroids. *J. Membr. Biol.* 144 : 93—110.
- Verrey F., Groscurth P., Bolliger U. 1995. Cytoskeletal disruption in A6 kidney cells: impact on endo/exocytosis and NaCl transport regulation by antidiuretic hormone. *J. Membr. Biol.* 145 : 193—204.
- Voilley N., Bassilana F., Migon C., Merscher S., Mattei M. G., Carle G. F., Lazdunski M., Barbry P. 1995. Cloning, chromosomal localization and physical linkage of the β and γ subunits (SCNN1A and SCNN1G) of the human epithelial amiloride-sensitive sodium channel. *Genomics.* 28 : 560—565.
- Voilley N., Lindneglia E., Champigny G., Mattei M., Waldmann R., Lazdunski M., Barbry P. 1994. The lung amiloride-sensitive Na^+ channel: biophysical properties, pharmacology, ontogenesis and molecular cloning. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 91 : 247—251.
- Volk K., Husted R. F., Snyder P. M., Stokes J. B. 2000. Kinase regulation of hENaC mediated through a region in the COOH-terminal portion of the α -subunit. *Amer. J. Physiol.* 278 : C1047—C1054.
- Wade J. B., Stanton B. A., Field M. J., Kashgarian M., Giebisch G. 1990. Morphological and physiological responses to aldosterone: time course and sodium dependence. *Amer. J. Physiol.* 259 : F88—F94.
- Waldmann R., Champigny G., Bassilana F., Voilley N., Lazdunski M. 1995. Molecular cloning and functional expression of a novel amiloride-sensitive Na^+ channel. *J. Biol. Chem.* 270 : 27 411—27 414.
- Welhling M. 1997. Specific, nongenomic action of steroid hormones. *Annu. Rev. Physiol.* 59 : 365—393.
- Wei Y., Lin D.-H., Kemp R., Yaddanapudi G. S. S., Nasjletti A., Falck J., Wang W.-H. 2004. Arachidonic acid inhibits epithelial Na channel via cytochrome P450 (CYP) epoxygenase-dependent metabolic pathways. *J. Gen. Physiol.* 124 : 719—727.
- Weisman W. P., Sinha S., Klahr S. 1977. Effect of insulin, ADH, and cyclic AMP on sodium transport in the toad urinary bladder. *Amer. J. Physiol.* 232 : F307—F314.
- Worrell R. T., Bao H.-F., Denson D. D., Eaton D. C. 2001. Contrasting effects of cPLA₂ on epithelial Na^+ transport. *Amer. J. Physiol.* 281 : C147—C156.
- Yamamura H., Ugawa S., Ueda T., Nagao M., Shimada S. 2004. Capsazepine is a novel activator of the δ subunit of the human epithelial Na^+ channel. *J. Biol. Chem.* 279 : 44 483—44 489.
- Yamamura H., Ugawa S., Ueda T., Nagao M., Shimada S. 2005a. Evans blue is a specific antagonist of the human epithelial Na^+ channel δ -subunit. *J. Pharm. and Exp. Ther.* 315 : 965—969.
- Yamamura H., Ugawa S., Ueda T., Nagao M., Shimada S. 2005b. Icilin activates the δ -subunit of the human epithelial Na^+ channel. *Mol. Pharmacol.* 68 : 1142—1147.
- Yanase M., Handler J. S. 1986. Activators of protein kinase C inhibit sodium transport in A6 epithelia. *Amer. J. Physiol.* 250 : C517—C522.
- Yorio T., Torres S., Tarapoom N. 1983. Alteration in membrane permeability by diacylglycerol and phosphatidylcholine containing arachidonic acid. *Lipids.* 18 : 96—99.
- Yu H., Chen J. K., Feng S., Dalgarno D. C., Brauer A. W., Schreiber S. L. 1994. Structural basis for the binding of prolin-rich peptides to SH₃ domains. *Cell.* 76 : 933—945.
- Yudowski G. A., Efendiev R., Pedemonte C. H., Katz A. I., Berggen P.-O., Bertorello A. M. 2000. Phosphoinositide-3 kinase binds to a prolin-rich motif in the Na^+/K^+ -ATPase α subunit and regulates its trafficking. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 97 : 6556—6561.
- Yue G., Malik B., Yue G., Eaton D. E. 2002. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) stimulates epithelial sodium channel activity in A6 cells. *J. Biol. Chem.* 277 : 11 965—11 969.
- Zabner J., Smith J. J., Karp P. H., Widdicombe J. H., Welsh M. J. 1998. Loss of CFTR chloride channels alters salt absorption by cystic fibrosis airway epithelia *in vitro*. *Mol. Cell.* 2 : 397—403.
- Zhainazarov A. B., Ache B. W. 1999. Effects of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phosphatidylinositol 4-phosphate on a Na^+ -gated nonselective cation channel. *J. Neurosci.* 19 : 2929—2937.

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ORGANIZATION OF Na⁺ TRANSPORT
IN EPITHELIAL SYSTEMS. I. EPITHELIAL Na⁺ CHANNELS*A. V. Melnitskaya, Z. I. Krutetskaya, O. E. Lebedev*Chair of Biophysics, St. Petersburg State University;
e-mail: zoya@mail.bio.pu.ru

The review summarizes recent data on the structural and functional organization and regulation mechanisms of Na⁺ transport in epithelial systems. The review is focused on the structure, function, regulation and pathology of epithelial Na⁺ channels, which are critical for Na⁺ homeostasis maintenance and blood pressure control.

Key words: Na⁺ transport, epithelial systems, amiloride-sensitive Na⁺ channels.
