

МЕХАНОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КАТИОННЫХ КАНАЛОВ СЕМЕЙСТВА DEG/ENaC

© Д. В. Вачугова,¹ Е. А. Морачевская

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹ электронный адрес: tarja.vdv@gmail.com

В обзорной статье обобщены современные представления о возможном участии катионных каналов семейства дегенерины/эпителиальные натриевые каналы (DEG/ENaC) в реакциях клеток на механическое раздражение. Проанализированы результаты электрофизиологических исследований механочувствительности натриевых каналов почечного эпителия и экспрессированных эпителиальных натриевых каналов (ENaC). Отражено разнообразие и значение методов, используемых для исследования механозависимой регуляции каналов. Специальное внимание уделено обсуждению и обоснованию функциональной роли механической чувствительности поляризованных клеток почки. Анализ данных позволяет заключить, что ENaC можно рассматривать как механочувствительный канал, активирующийся в ответ на стимуляцию потоком жидкости поверхности апикальной мембраны эпителиальных клеток почки. Обсуждается возможная молекулярная природа активации каналов ENaC в ответ на механическую стимуляцию клеточной поверхности.

К л ю ч е в ы е с л о в а: эпителиальный натриевый канал, ENaC, дегенерины, механочувствительность, поляризованные клетки почки.

Клетки различных организмов и тканей в процессе жизни постоянно подвергаются разнообразным механическим воздействиям — от перемещений на уровне молекул при изменениях температуры до потенциально деструктивных градиентов осмотического давления. Изучение путей передачи механического раздражения в нативных клетках занимает важное место в решении проблем клеточной регуляции и передачи сигнала. Механочувствительность плазматической мембраны и(или) клетки в целом связывают в первую очередь с функционированием в ней белковых образований — ионных каналов, активация и инактивация которых зависят от механического статуса. Такой класс ионных каналов, называемых механочувствительными, был обнаружен в электрофизиологических экспериментах с использованием метода патч-кламп (Hamill et al., 1981). Экспрессия и функционирование механозависимых мембранных структур, вероятно, являются универсальными свойствами живых клеток. В настоящее время механочувствительные каналы эукариотических клеток являются одним из наименее изученных классов ионных каналов и в то же время представляют особый интерес для понимания механизмов клеточной сигнализации.

К настоящему времени механочувствительные каналы найдены в тканях различной специализации. Есть основания полагать, что они вовлечены в целый ряд физиологически значимых реакций и процессов, таких как болевая чувствительность (Nakamura, Strittmatter, 1996; Burnstock, 1999), слух и вестибулярная функция (Howard et al., 1988; Hackney, Furness, 1995), контроль кровяного давления (Charleau, 1992; Burnstock, 1999), формирование тканей опорно-двигательного аппарата (Duncan, Turner, 1995), регуляция клеточного объема (Nilius, 1997;

Okada, 1997) и поддержание водно-солевого баланса организма (Bourque, Oliet, 1997). Что касается тканей выших животных и человека, то реакция на механическое раздражение особенно важна для поляризованных клеток почки: эпителиальные клетки нефрона млекопитающих постоянно должны отвечать на изменения осмотичности, динамики и объема внеклеточной жидкости. Вполне вероятно, что клеточные регуляторные механизмы реализуются, по крайней мере частично, с участием механочувствительных ионных каналов. Основной процесс, за счет которого происходит изменение внутриклеточного объема в почечном эпителии, — это транспорт ионов натрия, обеспечиваемый эпителиальными натриевыми каналами (ENaC), принадлежащими к семейству дегенерины/эпителиальные натриевые каналы (DEG/ENaC).

После клонирования ENaC (Canessa et al., 1993; Lingueglia, Voilley, 1993) было обнаружено, что существует гомология между субъединицами ENaC и несколькими генами (*mec-4*, *mec-10* и *deg-1*) из нематоды *C. elegans* как на уровне мРНК, так и на уровне белка. Было показано, что в клетках нематоды экспрессирующиеся с этих генов белки, называемые дегенеринами (degenerins), вовлечены в передачу механического стимула (Driscoll, Chalfie, 1991; Huang, Chalfie, 1994).

Сформировались представления о семействе катионных каналов DEG/ENaC, характеризующихся общностью молекулярной организации и мембранной топологии. Эти данные позволили предположить существование механозависимых путей регуляции ENaC. Первые работы, посвященные изучению взаимосвязи ENaC и механотрансдукции, появились более 10 лет назад, однако опубликованные результаты были на редкость противоречивы. До настоящего времени вопрос о механочувствительности

ENaC и ее природе остается открытым и сравнительно мало исследованным. Обращает на себя внимание тот факт, что как в отечественной, так и в англоязычной литературе до 2008 г. практически отсутствовали обзорные аналитические статьи, посвященные механочувствительным каналам семейства ENaC.

В настоящем обзоре мы хотели бы обобщить и систематизировать имеющиеся на сегодняшний день данные по этой теме и подвести некоторые итоги. Как показывает анализ литературы, клеточный ответ, в частности реакция каналов на механическое раздражение, чрезвычайно зависит от способа подачи стимула. В связи с этим специальное внимание уделено экспериментальным подходам и методам исследования. Рассмотренные результаты позволяют заключить, что для нативных эпителиев функционально значимой, вероятно, является механозависимая регуляция натриевых каналов, связанная с изменениями скорости потока внеклеточной жидкости.

ENaC: молекулярная организация, краткая биофизическая характеристика, физиологическая роль

Семейство DEG/ENaC включает в себя натрийпроводящие каналы, блокируемые диуретиком амилоридом. DEG/ENaC экспрессируются в различных возбудимых и невозбудимых тканях и, по-видимому, участвуют в разнообразных метаболических и сенсорных процессах, требующих эффективного переноса ионов натрия, таких как болевая чувствительность и механочувствительность, о которой пойдет речь в данном обзоре. Несмотря на то что представители суперсемейства DEG/ENaC функционально гетерогенны, они обладают сходными биофизическими свойствами и структурной организацией. К настоящему времени описано свыше 30 представителей этого семейства (Benos et al., 1997).

Было показано, что ENaC образован тремя субъединицами — α , β и γ , примерно на 35 % совпадающими между собой по аминокислотному составу (Canessa et al., 1994). Субъединицы ENaC содержат от 632 до 698 аминокислотных остатков, мол. масса субъединиц составляет примерно 90 кДа (Benos et al., 1997). Организация и мембранная топология субъединицы ионного канала семейства DEG/ENaC показаны на рис. 1. Предполагается, что каждая субъединица ENaC состоит из пяти различающихся по структуре и функциям доменов: цитоплазматического N-конца, двух коротких трансмембранных сегментов (M1 и M2), экстраклеточного фрагмента и цитоплазматического C-конца (см. рис. 1). Следует обратить внимание на характерную структурную особенность мембранной топологии белков DEG/ENaC — наличие крупной внеклеточной петли (около 50 кДа) (Benos et al., 1995). Известные особенности молекулярной структуры дают основания для предположений относительно функциональных свойств канала, в частности возможной механочувствительности.

На начальном этапе изучения структуры ENaC, в 90-х годах XX в., исследователи пришли к выводу о том, что нативный канал представляет собой гетеротетрамер, образованный двумя α -, одной β - и одной γ -субъединицей, располагающимися вокруг поры, в которой две α -субъединицы располагаются друг напротив друга (Kellenberger, Schild, 2002). Однако в последние годы опубликованы работы, в которых предлагается нонамерная ($3\alpha : 3\beta :$

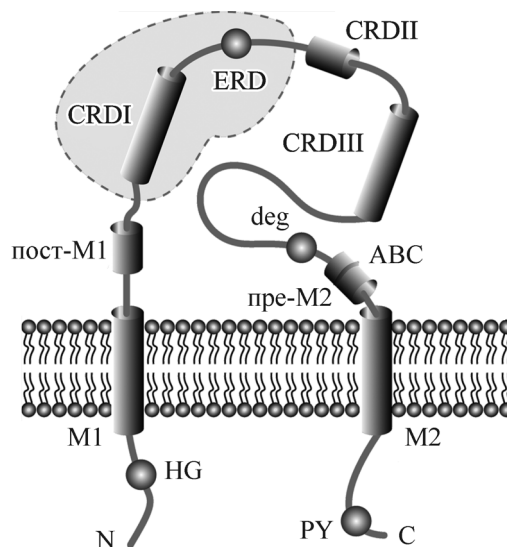


Рис. 1. Топология субъединиц каналов семейства дегенерины/эпителиальные натриевые каналы (DEG/ENaC) в мембране.

M1, M2 — трансмембранные сегменты; ABC — вероятный сайт связывания блокатора эпителиальных натриевых каналов (ENaC) — амилорида; HG — консервативный фрагмент His-Gly в составе консервативного цитоплазматического N-терминального домена; post-M1 — участок аминокислот, следующий непосредственно за M1; CRDI—CRDIII — богатые цистеином фрагменты; ERD — регуляторный фрагмент в составе экстраклеточного домена; pre-M2 — участок гидрофобных аминокислот, располагающийся перед M2; PY — фрагмент, высококонсервативный для представителей семейства ENaC, богат пролином (PPPXY); deg — экстраклеточный воротный домен. Фрагменты ERD и CRDI — консервативные для семейства DEG/ENaC.

3γ) или тримерная ($\alpha : \beta : \gamma$) организация канала (Staruschenko et al., 2005). Последнее предположение может рассматриваться как наиболее вероятное, поскольку методом атомно-силовой микроскопии недавно показана тримерная ($\alpha : \beta : \gamma$) структура для канала ASIC (acid-sensing ion channel), также принадлежащего к семейству DEG/ENaC канала (Carnally et al., 2008).

По биофизическим характеристикам ENaC достаточно неоднородны, однако главным характеристическим признаком семейства ENaC является чувствительность к ингибирующему действию амилорида и его аналогов в субмикромольных концентрациях (Kellenberger, Schild, 2002). Полагают, что высокоаффинный участок связывания амилорида расположен в наружном устье поры и образован аминокислотными остатками α Ser583, β Gly525 и γ Gly537 (Schild et al., 1997). В разных эпителиях можно найти каналы с одинаковой аффинностью к амилориду, но с разными селективностью (соотношение проницаемостей P_{Na}/P_K от 1 до 10 и выше), проводимостью (от 3 до 40 пСм) и кинетическими характеристиками. Предложено выделять три вида амилорид-чувствительных каналов: каналы с высокой селективностью Na^+ по отношению к K^+ , каналы со средней селективностью и неселективные катионные каналы (Garty, 1994).

ENaC экспрессируются в апикальных мембранах реабсорбирующих почечных эпителиев и играют важнейшую роль в регуляции водно-солевого баланса организма. Реабсорбция и трансэпителиальный перенос натрия в поляризованной клетке почечного эпителия происходит при участии каналов апикальной мембраны, обеспечивающих пассивный транспорт ионов натрия в клетку, и Na/K -АТФазы базолатеральной мембраны, обеспечивающей энергозависимый обмен натрия на ионы

калия (Eaton, Hamilton, 1988; Palmer, 1992). ENaC экспрессируется в апикальной мембране основных клеток дистального нефрона, дыхательных путей и альвеолярном эпителии легких, клетках эпителиальной выстилки толстого кишечника и мочевого пузыря, протоков слюнных и потовых желез (Ahn et al., 1999). Реабсорбция натрия в собирательных трубках почки играет ключевую роль в обеспечении электролитического и водного гомеостаза и, следовательно, кровяного давления. В органах дыхания транспорт натрия вовлечен в регуляцию объема и состава жидкости, омывающей воздухоносные пути (Hummler et al., 1996). Дисфункции ENaC могут привести к патологии кровяного давления, серьезным нарушениям баланса жидкости в тканях и минерального обмена на уровне всего организма. Так, показано, что мутация, приводящая к частичной потере функции ENaC, вызывает так называемый псевдогипоальдостеронизм — серьезную патологию, характеризующуюся диурезом с потерями соли (Chang et al., 1996).

Механочувствительность каналов семейства DEG/ENaC: теоретические предпосылки и функциональная значимость

Предположения о возможной связи ENaC с механочувствительностью возникли как следствие обнаруженной гомологии в первичной последовательности субъединиц ENaC и механочувствительных белков дегенеринов, экспрессирующихся в *C. elegans*. В геноме этой нематоды был найден ген *mec*, предположительно кодирующий механочувствительные ионные каналы (Driscoll, Chalfie, 1991). Поиск мутаций у нематод, обладающих аномальной реакцией на механический стимул (в сравнении с диким типом), показал, что мутации *mec* приводят к потере тактильной чувствительности и (или) деградации механочувствительных нейронов *C. elegans* (Chalfie, Au, 1989). Косвенным аргументом в пользу механочувствительности ENaC может служить тот факт, что субъединицы канала экспрессируются в тканях, которые очевидным образом подвержены механической стимуляции *in vivo*, например в эндотелии сосудов (Drummond et al., 2004) и нервных окончаниях конечностей (Drummond et al., 2000). При этом не только обнаружена экспрессия субъединиц ENaC, но и показано блокирование натриевых токов амилоридом, что приводит к частичной потере чувствительности к механическому стимулу.

Было неоднократно показано, что в собирательных путях почки транспорт неорганических катионов существенным образом зависит от протока жидкости и, по-видимому, управляется с участием механозависимых структур (Muto, 2001; Wu, Gao, 2007). Важно также отметить, что основная экспрессия ENaC была обнаружена именно в клетках собирательных канальцев коркового вещества почек млекопитающих, фрагменте нефрона, который подвержен постоянным изменениям скорости потока жидкости. Скорость потока в дистальной части нефрона, включая почечные канальцы, возрастает в ответ на увеличение внеклеточного объема и соответственно падает при его снижении (Giebisch, 1998). Эти данные свидетельствуют о физиологической значимости реакций апикальной мембраны почечного эпителия на изменения механического статуса. ENaC представляют собой один из основных регуляторов транспорта ионов натрия в почке, и именно с

их функционированием могут быть связаны механозависимые адаптивные ответы, имеющие существенное значение в обеспечении ионного гомеостаза.

Методы исследования механозависимой регуляции каналов

Следует отдельно остановиться на различных методах изучения механочувствительности ENaC. Разнообразие в подходах поможет в дальнейшем объяснить некоторые несоответствия и разногласия, встречающиеся в экспериментальных работах по этой тематике. Опыт электрофизиологических исследований механочувствительных каналов в разных типах клеток также демонстрирует, насколько полученные результаты и их интерпретация зависят от экспериментальной модели и используемого способа подачи механического стимула (Hamill, McBride, 1996; Hamill, Martinac, 2001).

Механочувствительность ионных каналов плазматической мембраны может предположительно реализовываться двумя способами — либо за счет деформации липидного бислоя и передачи таким образом механического напряжения на каналный белок, что ведет за собой изменение его конформации, либо непосредственно за счет действия механического стимула на чувствительный элемент в структуре самого канала (Hamill, Martinac, 2001).

Способы подачи механического стимула, которые были применены для исследования механочувствительности ENaC, условно можно разделить на две группы. 1. Растяжение и (или) деформация мембраны путем создания разности гидростатического давления, в частности приложения «отрицательного» давления непосредственно через патчевую пипетку (а) или путем изменения клеточного объема вследствие смещения осмотичности в клеточных растворах, внутриклеточных инъекций и др. (б) (Achard et al., 1996; Ismailov et al., 1997; Kizer et al., 1997; Awayda, Subramanyam, 1998). 2. Механическая стимуляция за счет изменения скорости потока жидкости вдоль поверхности исследуемых клеток (shear force) (Carattino et al., 2005; Morimoto et al., 2006; Althaus et al., 2007).

Рассмотрим подробнее, как осуществлялась подача стимулов, которые мы условно отнесли к первой, весьма неоднородной, группе. На рис. 2 показана схема эксперимента для исследования механочувствительности каналов в модельной мембране путем создания разности гидростатического давления. Бислойную липидную мембрану формировали на отверстии диаметром 100—200 мкм в тефлоновой перегородке, разделяющей две камеры равного объема, первоначально заполненные солевым раствором до одинакового уровня. После встраивания исследуемого белка-каналоформера (например, субъединицы ENaC) по ходу эксперимента раствор добавляли только с одной стороны и таким образом создавали градиент гидростатического давления за счет разности уровней жидкости с двух сторон мембраны, содержащей исследуемый канал (Ismailov et al., 1997). В электрофизиологических экспериментах на нативных клетках для растяжения мембраны часто используется способ подачи «отрицательного» давления к участку мембраны непосредственно через регистрирующую пипетку — так называемое присасывание (Kizer et al., 1997; Awayda, Subramanyam, 1998). Этот метод стимуляции мембраны имеет свои преимущества: он позволяет регистрировать активность именно одиноч-

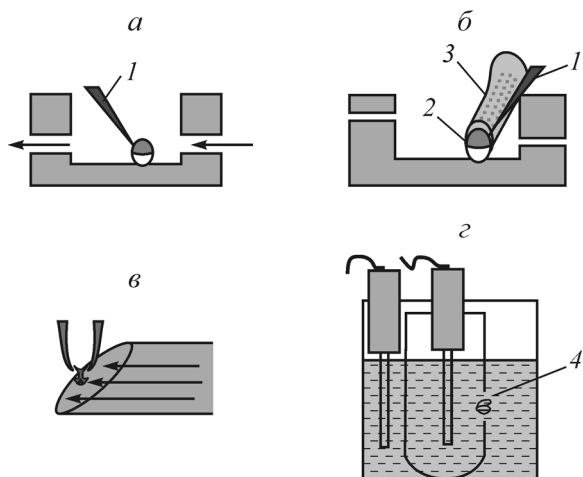


Рис. 2. Схемы методов исследования механозависимой регуляции ионных токов.

Стимуляция клеточной поверхности потоком жидкости путем перфузии через камеру (а) и с помощью дополнительной микропипетки, расположенной вблизи мембраны (б); 1 — регистрирующая пипетка, 2 — клетка, 3 — перфузионная пипетка, в — стимуляции потоком жидкости (стрелки) фрагмента мембраны, ориентированного цитоплазматической стороной в раствор; г — установка для изучения каналов, встроенных в модельную липидную мембрану (4), сформированную на отверстии в тefлоновой перегородке.

ных каналов (в конфигурации cell-attached метода патч-кламп), а значит, определять изменения в проводимости каналов и вероятности их открытого и закрытого состояний в ответ на стимул. Однако стоит отметить, что в этом случае исследователь не контролирует форму, которую может принимать фрагмент мембраны, ограниченный отверстием пипетки; предполагается, что степень деформации коррелирует с величиной стимула — разностью давлений. В этом случае предпочтительно использовать компьютерное устройство для точного мониторинга величины прилагаемого давления.

Еще один вариант механической стимуляции мембраны и (или) клетки в целом — это смещение осмотичности внеклеточного раствора. Повышение осмотичности ведет к уменьшению клеточного объема, т. е. к сжатию клетки и мембраны, а понижение — к увеличению объема (набуханию) клетки и, следовательно, увеличению видимой площади клеточной поверхности (Awayda, Subramanyam, 1998). Полагают, что при этом имеет место незначительное растяжение мембраны, а основные изменения связаны с расправлением складок поверхности клетки, как говорят, «распрямлением» мембраны. Аналогичного эффекта «распрямления» мембраны можно добиться путем внутриклеточных инъекций изотонического раствора хлорида калия; однако это методически сложно и можно использовать только для достаточно крупных клеток, таких как ооциты *Xenopus* (Kizer et al., 1997; Awayda, Subramanyam, 1998; Carattino et al., 2005; Althaus et al., 2007).

Методики, направленные на выявление реакций клетки на изменения динамики внеклеточной жидкости, по своей сути более однородны (Carattino et al., 2005; Althaus et al., 2007). Как правило, в режиме whole-cell стандартным образом осуществляется регистрация трансмембранных токов с помощью стеклянной микропипетки, образующей высокоомный контакт с мембраной. С помощью второй микропипетки, расположенной на небольшом расстоянии от поверхности клетки, создают проток жидкости, что и представляет собой механический стимул (см.

рис. 2, б); в ходе эксперимента варьируется скорость потока. В некоторых работах применяли перфузию, т. е. проток жидкости через весь объем камеры, в которой находились исследуемые клетки (рис. 2, а) (Morimoto et al., 2006; Althaus et al., 2007). Используя описанную принципиальную схему, удалось наблюдать влияние потока на активность натриевых каналов в изолированном мембранном фрагменте, обращенном наружной поверхностью в омывающий раствор (вариант outside-out; рис. 2, в). Очевидное преимущество такого подхода состоит в возможности оценить эффекты на уровне одиночных каналов.

Выявление механочувствительности ENaC с помощью различных экспериментальных моделей

Первые данные в пользу предположений о том, что ENaC отвечают на механический стимул, получены в лаборатории Беноса (Benos et al., 1995; Ismailov et al., 1997). После клонирования и очистки α -субъединицу ENaC быка встраивали в бислоюную липидную мембрану, сформированную по методу Мюллера (так называемые мембраны с растворителем). Эта модель использовалась для исследования возможной чувствительности ENaC к изменениям гидростатического давления, как описано выше (см. рис. 2, г). Было показано, что приложение стимула разности давления увеличивает активность встроенного в липидный бислой канала: вероятность открытого состояния существенно возрастала. Эти данные были подтверждены в экспериментах на ооцитах *Xenopus* и несколько позже той же группой авторов в работе на ооцитах и липидных бислоях с клонированным ENaC крысы (Ismailov et al., 1997). Однако нужно отметить, что биофизические свойства зарегистрированных каналов (в том числе значение проводимости около 40 пСм) не позволяли однозначно идентифицировать их как ENaC, что вызывало сомнения относительно трактовки результатов и стало поводом для дискуссии (Rossier, 1998). Проведено также исследование реакций ENaC на механическую стимуляцию при изменениях осмотичности внеклеточного раствора (Ji et al., 1998). Авторы показали, что в ооцитах лягушки, экспрессирующих все три субъединицы ENaC, увеличение клеточного объема, вызванное понижением осмотичности раствора, ведет к снижению активности ENaC, а уменьшение объема клетки («сжатие») — к росту этой активности.

В дальнейшем группа Беноса продолжила изучение механочувствительности натриевых каналов, выбрав в качестве объекта исследования В-лимфоциты человека (Aschard et al., 1996). В лимфоцитах была выявлена амилорид-чувствительная компонента тока, реагирующая на механическую стимуляцию (создавали градиент гидростатического давления). Сообщается, что приложение гидростатического давления вызывало значительное увеличение токов входящего направления в большинстве экспериментов. Авторы впервые поставили вопрос о соответствии используемого стимула и экспериментальной модели физиологическим условиям. Адекватным было бы применение стимула (давления), не вызывающего поврежденный мембран нативных клеток. Следует отметить, что авторы сообщали также о снижении чувствительности ENaC к амилориду при активации токов в ответ на смещение гидростатического давления.

О взаимосвязи активности ENaC с прилагаемым к клеткам механическим стимулом свидетельствовали данные Кизер с коллегами (Kizer et al., 1997). При экспрессии α -субъединицы ENaC в фибробластах мышцы была показана активация одиночных и интегральных амилорид-чувствительных токов при механической стимуляции: ответ зарегистрирован в 23 из 79 патчей. Однако однозначно интерпретировать полученные результаты сложно, так как, во-первых, была экспрессирована только одна субъединица канала, а во-вторых, существуют данные о том, что фибробласты содержат эндогенные механочувствительные ионные каналы (Wan et al., 1999). Ма с коллегами (Ma et al., 2002) сообщали, что амилорид-чувствительный ток в клетках почек линии A6 может быть активирован растяжением мембраны, причем эффект механической стимуляции компенсируется за счет выброса АТФ.

Рассмотренные результаты в целом свидетельствуют о том, что механозависимые изменения функциональных свойств ENaC действительно имеют место. Однако возникают вопросы относительно идентификации каналов, которым приписывали ответ на механическую стимуляцию. Кроме того, появился ряд работ, результаты которых ставят под сомнение обнаруженную механочувствительность ENaC. В хронологическом порядке первым в этом ряду было исследование механозависимой регуляции ENaC в нативных клетках почечного эпителия (Palmer, Frindt, 1996). В конфигурации cell-attached в 6 из 22 патчей наблюдали быстрое и обратимое увеличение вероятности открытого состояния канала (в среднем от 0.05 до 0.22) при подаче давления непосредственно через патчевую пипетку. Несмотря на регистрацию ответа в части экспериментов, с точки зрения авторов, эти данные не свидетельствовали о существовании механозависимой активации ENaC. Авторы полагали, что различие в ответах — следствие выбранного протокола стимуляции, так как в конфигурации cell-attached на эффект может повлиять локальная деформация мембраны в патчевой пипетке. Надо отметить, что в используемом варианте метода патч-кламп регистрируются токи в небольшом участке мембраны. Ответ на подачу стимула только в части экспериментов означает, что плотность исследуемых каналов не очень высока, а также, возможно, отражает кластерную локализацию каналов. Сказанное означает, что экспериментальные результаты данной работы могли бы быть интерпретированы противоположным образом — как аргумент в пользу предположений о механочувствительности нативных каналов почечного эпителия.

Заслуживают внимания результаты детального исследования регуляции ENaC в зависимости от натяжения мембраны ооцитов при инъекции мРНК (Awayda, Subramanyan, 1998). В экспериментах с использованием различных вариантов метода патч-кламп авторы не выявили чувствительности каналов к механической стимуляции, в том числе и после разрушения актинового цитоскелета; предполагалось, что интактный цитоскелет мог препятствовать активации каналов. В качестве стимула использовали не только изменение давления в регистрирующей пипетке (при работе с одиночными каналами), но также и увеличение клеточного объема при смещении осмотичности внеклеточных растворов или инъекции изотонического раствора хлорида калия. Ни один метод не дал ожидаемого результата — увеличения амилорид-чувствительной компоненты интегрального тока (вариант whole-cell) или повышения вероятности открытого состояния канала (в конфигурации cell-attached). Делая вывод об отсут-

ствии механозависимой активации, авторы отмечают, что в отсутствие стимула (контроль) наблюдали спонтанные переключения между состояниями с высокой и низкой вероятностью открытого состояния.

Как видно из представленного материала, результаты исследований механочувствительности ENaC весьма противоречивы. Экспериментальные данные трактовались настолько неоднозначно даже самими авторами, что это послужило поводом для их дополнительного рассмотрения и дискуссии. Так, в критическом комментарии Россьера (Rossier, 1998) обсуждаются достоинства и недостатки применяемых методов (Awayda, Subramanyan, 1998). Действительно, очевидная слабость обеих модельных систем (искусственных липидных бислоев и ооцитов), использованных ранее для исследования механической чувствительности, заключается в отсутствии клеточных компонентов, которые могут играть решающую роль в передаче механического раздражения. При встраивании субъединиц ENaC в липидный бислой следует учитывать проблемы фолдинга белков, необходимость олигомеризации и сборки субъединиц для формирования физиологически активного канала. Известно также, что в процессе выделения и очистки интегральных белков в большинстве случаев теряется то специфическое липидное окружение, которое необходимо для сохранения их функциональных свойств. Особенно это касается белков, ассоциированных с детергент-устойчивыми липидными доменами (рафтами) в клеточных мембранах. Имеющиеся данные (Hill et al., 2002; Shlyonsky et al., 2003) свидетельствуют о том, что ассоциация ENaC с рафтами весьма вероятна. Кроме того, биофизические свойства каналов, регистрируемых в бислоях (Awayda, Subramanyan, 1998) и экспрессированных в ооцитах лягушки (Althaus et al., 2007), не соответствовали каноническим характеристикам ENaC (Garty, Palmer, 1997). Все эти обстоятельства ставят под сомнение полученные в ряде работ аргументы в пользу механочувствительности ENaC.

Таким образом, рассмотренные результаты разных научных групп не позволяют сделать какой-либо однозначный вывод о наличии или отсутствии механозависимой активации ENaC. Вопрос оставался открытым также из-за чрезвычайного разнообразия экспериментальных подходов, использованных клеточных систем и модельных мембран, а также экспрессии разного набора субъединиц канала. Прогресс в изучении и понимании возможной механочувствительности ENaC наметился благодаря исследованиям взаимосвязи функций и активности каналов апикальных мембран с динамикой жидкости в различных отделах нефрона.

Активация натриевых каналов при механической стимуляции потоком жидкости

Реабсорбирующие эпителии, характеризующиеся высоким уровнем экспрессии ENaC, в физиологических условиях испытывают колебания скорости потока жидкости, и наиболее очевидным примером может служить перемещение мочи по почечным канальцам (Giebisch, 1998). Новые попытки выявления и изучения механочувствительности ENaC в большей степени учитывали физиологию почки (Ma et al., 2002; Morimoto et al., 2006).

Механическую стимуляцию клеточной поверхности протоком жидкости моделировали с помощью подачи

струи раствора, направленной на поверхность мембраны. В первой из рассматриваемой серии работ в качестве объектов исследования были выбраны ооциты *Xenopus*, в которых методом инъекций мРНК были оверэкспрессированы ENaC, и свежeweделенные собирательные канальца коркового вещества почек кролика (Satlin et al., 2001). В обоих случаях наблюдали увеличение адсорбции натрия при повышении скорости потока жидкости. В ооцитах, экспрессировавших все три субъединицы канала, перфузия внеклеточной жидкостью (скорость 4–6 мл/мин) вызывала увеличение интегрального натриевого тока более чем в 3 раза. Рассмотренные результаты представляют серьезный аргумент в пользу существования и значимости механозависимой регуляции ENaC в физиологических условиях. Этот вывод был подтвержден в последующих исследованиях активации натриевых токов в ответ на стимуляцию потоком (Carattino et al., 2005; Morimoto et al., 2006; Althaus et al., 2007).

Полученные данные позволяют приблизиться к ответу на вопрос о том, чем обусловлен регистрируемый клеточный ответ на механический стимул. Было показано, что разрушение микротрубочек при обработке колхицином, так же как и блокирование везикулярного транспорта (обработка брeфелдином А), не изменяет ответ на стимуляцию потоком жидкости (Morimoto et al., 2006). Эти данные свидетельствуют о том, что механозависимая активация натриевых токов не связана с возможными изменениями трафика и количества субъединиц канала в мембране. Естественно полагать, что механозависимая активация натриевых токов обусловлена именно изменением воротных свойств и соответственно кинетических характеристик одиночных каналов. Такие ионные каналы, активность которых регулируется в зависимости от механического стимула, и принято называть механочувствительными; уровень активности каналов, как правило, количественно оценивают с помощью значений вероятности открытого состояния канала, определяемой из соотношения времен пребывания канала в открытом и закрытом состояниях.

Представляют интерес работы двух групп исследователей, в которых были получены доказательства того, что механочувствительная активация ENaC действительно отражает изменения функциональных свойств одиночного канала. На ооцитах *Xenopus*, экспрессировавших все три субъединицы ENaC мыши, было показано, что проток внеклеточной жидкости вызывает обратимое увеличение бензамил-чувствительного интегрального тока (Carattino et al., 2003). Была также найдена мутация ENaC, которая ведет к повышению вероятности открытого состояния канала (Carattino et al., 2005). Авторы обнаружили, что ооциты, экспрессировавшие канал с данной мутацией, не чувствительны к активации протоком, т. е. рассматриваемые «стимулирующие» эффекты неаддитивны. Вторым веский аргумент в пользу механочувствительности молекулярного комплекса ENaC был получен в экспериментах с внеклеточной обработкой трипсином (Morimoto et al., 2006). Ранее было показано, что при обработке внеклеточных доменов ENaC протеазами (в том числе трипсином) значительно возрастает вероятность открытого состояния канала (Hughey et al., 2004). Как и в экспериментах с мутацией, эффекты протеолитической обработки и стимуляции протоком неаддитивны (Morimoto et al., 2006).

Важные данные относительно природы механозависимой активации ENaC были получены в исследованиях

на ооцитах *Xenopus* при использовании технически наиболее совершенного подхода — регистрации активности каналов в конфигурации outside-out, т. е. при непосредственной подаче стимула (потока жидкости) к внешней поверхности фрагмента мембраны (рис. 2) (Althaus et al., 2007). Проведенный в этой работе анализ характеристик одиночных каналов доказывает, что стимуляция потоком жидкости приводит именно к изменению кинетики — повышению вероятности открытого состояния.

Итак, последние исследования в этой области позволяют заключить, что стимуляция поверхности потоком жидкости — это наиболее адекватный в физиологическом отношении стимул для активации ENaC — повышения вероятности открытого состояния канала. Важно отметить, что в этом случае сходные, не противоречащие друг другу данные были получены на разных экспериментальных моделях — в ооцитах *Xenopus*, в которых методом инъекции мРНК были экспрессированы разные ортологи ENaC, и в нативных клетках почечных канальцев.

Предполагаемые молекулярные механизмы механочувствительности ENaC

Полученные экспериментальные данные позволяют предложить гипотезы относительно молекулярных механизмов, лежащих в основе обнаруженной чувствительности натриевых каналов апикальных мембран почечного эпителия к изменяющейся скорости потока внеклеточной жидкости (Carattino et al., 2003). Предполагается, что поток жидкости активирует ENaC, влияя каким-то образом на состояние внеклеточных доменов канала. Эта идея кажется достаточно разумной, поскольку известно, что до двух третей общей массы субъединиц канала сосредоточено во внеклеточной области (Kellenberger, Schild, 2002). Такая топология позволяет представить себе внеклеточные петли ENaC как некие сенсоры, направленные в просвет канальца (рис. 3). Имеющиеся данные относительно молекулярной структуры белков семейства DEG/ENaC *a priori* дают основание полагать, что консервативные, богатые цистеином домены CRD (cystein rich domains), локализованные на каждой внеклеточной петле субъединиц ENaC (рис. 1), вовлечены в модуляцию активно-

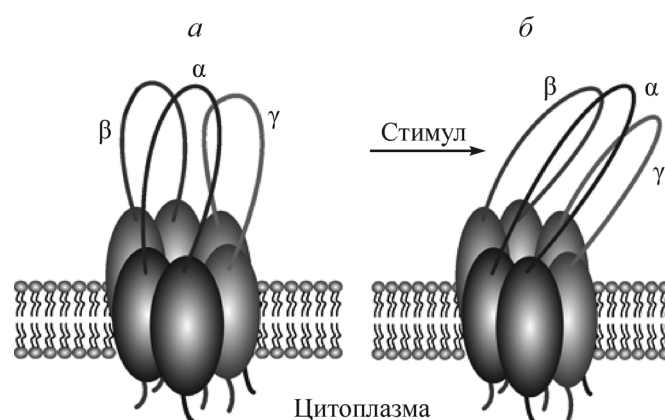


Рис. 3. Возможная модель механочувствительности эпителиального натриевого канала (ENaC), представленного в виде гетеротримера.

a — внеклеточные петли свободно находятся с наружной стороны клеточной мембраны; *b* — реакция на изменения скорости и давления внеклеточной жидкости.

сти канала (Tavernarakis, Driscoll, 2000; Kellenberger, Schild, 2002).

Путем направленного мутагенеза в структуре α -субъединицы был выявлен участок, вероятно вовлеченный в передачу механического сигнала; он локализован внутри домена пре-M2 α -субъединицы канала между аминокислотами 580 и 589, т. е. в пограничной области между внеклеточной петлей и трансмембранным доменом (Carattino et al., 2005). Аминокислотные замены в этом регионе привели к изменениям реакции каналов на стимуляцию потоком жидкости; изменялись преимущественно временные параметры, а также и амплитуда ответа. Как полагают авторы, внеклеточная петля ENaC каким-то образом «чувствует» движения частиц и жидкости и передает сигнал на воротный аппарат канала. Согласно предложенной гипотезе, домен пре-M2 отвечает за воротные свойства канала (Carattino et al., 2005). Обсуждаемый механизм по существу предлагает функциональную схему активации канала, выделяя две структуры — воротный аппарат и собственно механосенсор, предположительно локализованный на внешней поверхности мембраны. Дальнейшие соображения и гипотезы касаются сенсорной части, собственно воротный механизм остается за рамками дискуссии.

Два варианта работы сенсора рассматриваются как наиболее вероятные: 1) внеклеточные петли ENaC воспринимают механический стимул напрямую; 2) петли связаны с компонентами внеклеточного матрикса, которые являются посредниками в передаче стимула. Вторая возможность основывается на филогенетическом родстве ENaC и дегенеринов: действительно, природа механочувствительного комплекса *C. elegans* наиболее изучена. Механорецепторный комплекс дегенеринов представляет собой сложную структуру, состоящую из различных белков: порообразующих субъединиц, белков, формирующих подходящее окружение, компонент внеклеточного матрикса и тубулинов (Kung, 2005; Voukoutas, Chalfie, 2007). Показано, что этот комплекс активируется натяжением на мембране, которое влечет за собой конформационные изменения в порообразующих субъединицах (Voukoutas, Chalfie, 2007). Для *C. elegans* взаимодействие порообразующих субъединиц дегенеринов и внеклеточного матрикса определяет ответ на механический стимул (Emtage et al., 2004). Пока недостаточно данных, чтобы судить о том, какой механизм реализуется при передаче механического сигнала в нативном почечном эпителии. Необходимо более детальная информация о точной структуре внеклеточных доменов ENaC, об их взаимодействии с внеклеточным окружением, о сборке и стехиометрии субъединиц канала.

Возможная роль ENaC в обеспечении механосенсорных функций в различных неэпителиальных тканях

В некоторых тканях неэпителиального происхождения значимость физиологических реакций на механическое раздражение особенно очевидна, хотя природа механочувствительности все еще неясна. Известно, что механосенсорные образования являются необходимым регуляторным компонентом сердечно-сосудистой системы. Достаточно давно появились предположения, согласно которым за передачу механического стимула могут отвечать ионные каналы. Так, например, барорецепторные

нейроны должны включать в себя сенсорные элементы для кратковременного контроля кровяного давления, и весьма вероятно здесь участие механочувствительных ионных каналов (Sheperd, Mancina, 1986; Kumada et al., 1990).

Есть основания полагать, что в гладкомышечных клетках сосудов механочувствительные ионные каналы могут служить первой ступенью при переводе механического стимула (натяжения) в физиологический ответ, т. е. сокращение или расслабление стенок сосудов (Drummond et al., 2001, 2004). Вопрос о молекулярной природе комплексов, которые ответственны за перевод механического стимула в нейрональный ответ, пока остается открытым. В недавних исследованиях было показано, что в механочувствительных нейронах экспрессируются субъединицы ENaC β и γ , а также то, что известные ингибиторы ENaC амилорид и бензамил препятствуют передаче механического стимула в артериальных барорецепторных нейронах (Drummond et al., 2001). Эти данные позволяют предположить, что субъединицы эпителиального натриевого канала могут претендовать на роль механозависимых сенсоров; отсутствие экспрессии α -субъединицы в нейрональных клетках говорит о том, что конститутивно активный канал в них, скорее всего, не формируется, однако двух субъединиц ENaC, вероятно, может хватать для функционирования механочувствительного комплекса с достаточным для данной ткани набором свойств.

Интересные данные в поддержку гипотезы о том, что субъединицы ENaC могут работать как элементы механосенсоров в неэпителиальных тканях, были получены для гладкомышечных клеток церебральных артерий крысы (Drummond et al., 2004). Авторами этой работы было обнаружено, что субъединицы β и γ экспрессируются в свежеизолированных клетках гладкой мускулатуры сосудов, к тому же характеристические блокаторы ENaC амилорид и бензамил ингибировали миогенные сокращения в изолированных церебральных артериях не менее чем на 50 % (Drummond et al., 2004). Иммуноокрашивание показало, что β - и γ -субъединицы ENaC локализованы у мембраны или на ней, а также, вероятно, кластеризуются, что говорит об их возможной ассоциации при формировании механосенсора (Drummond et al., 2004).

Таким образом, имеющиеся результаты дают основания предполагать, что субъединицы ENaC играют существенную роль в механотрансдукции в неэпителиальных тканях, в частности в механосенсорных нейронах и рецепторных образованиях (Drummond et al., 2000). Эти данные подтверждают функциональную и структурную общность мембранных белков — ENaC и дегенеринов *C. elegans* — потенциальных участников передачи механического стимула. Важно отметить, что если в почечном эпителии определяющее значение для механочувствительности ENaC имеет стимуляция потоком, то в других тканях и органах механозависимые реакции менее специализированы, что, по-видимому, предполагает и различия молекулярной природы механотрансдукции.

Перспективы дальнейших исследований

Предположения о механочувствительности катионотранспортирующих каналов семейства DEG/ENaC возникли на основании обнаруженного филогенетического родства механочувствительных белков-дегенеринов и ENaC. Результаты многочисленных исследований активации ENaC в ответ на растяжение мембраны оказались

весьма противоречивыми и неоднозначными. Прогресс наметился в экспериментальных исследованиях, учитывающих структурно-функциональную организацию нефрона и физиологическую значимость механозависимых реакций почечного эпителия. Обнаружены изменения натриевых токов и уровня активности каналов в ответ на раздражение клеточной поверхности потоком жидкости, что, вероятно, является наиболее адекватным механическим стимулом для апикальной мембраны почечного эпителия. Реакция на механическую стимуляцию, по-видимому, присуща и другим каналообразующим белкам семейства DEG/ENaC, однако феноменология эффектов менее отчетлива. Анализ данных позволяет заключить, что ENaC можно рассматривать как механочувствительный канал, активирующийся в ответ на стимуляцию потоком жидкости поверхности апикальной мембраны поляризованных клеток почки. Механозависимая регуляция катионных каналов DEG/ENaC, возможно, представляет собой новый механизм негормональной регуляции транспорта ионов и водно-солевого обмена на уровне клеток и тканей. В этом отношении особенный интерес представляет изучение механочувствительности ENaC, экспрессирующихся в различных неэпителиальных тканях, в которых функциональная роль данных каналов менее понятна. Дальнейшие исследования будут также способствовать выяснению молекулярных основ механочувствительности ENaC и других белков семейства DEG/ENaC. Имеющиеся результаты дают основания для гипотез о вероятной роли внеклеточных доменов как механосенсоров. В целом механочувствительные каналы в клетках эукариот остаются малоизученными, их молекулярная природа неясна. Новые данные относительно регуляции каналов DEG/ENaC будут способствовать выяснению фундаментальных основ транспорта ионов в электронеозбудимых клетках. Важным направлением должно быть изучение роли цитоскелета и внеклеточного матрикса в механозависимой активации каналов DEG/ENaC в различных типах эукариотных клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00574).

Список литературы

- Achard J. M., Bubien J. K., Benos D. J., Warnock D. G. 1996. Stretch modulates amiloride sensitivity and cation selectivity of sodium channels in human B lymphocytes. *Amer. J. Physiol.* 270 : 214—223.
- Ahn Y. J., Brooker D. R., Kosari F. 1999. Cloning and functional expression of the mouse epithelial sodium channel. *Amer. J. Physiol.* 277 : 121—129.
- Althaus M., Bogdan R., Clauss W. G., Fronius M. 2007. Mechano-sensitivity of epithelial sodium channels (ENaCs): laminar shear stress increases ion channel open probability. *FASEB J.* 21 : 2389—2399.
- Awayda M. S., Subramanyam M. 1998. Regulation of epithelial Na⁺ channel by membrane tension. *J. Gen. Physiol.* 112 : 97—111.
- Benos D. J., Awayda M. S., Ismailov I. L., 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.
- Bounoutas A., Chalfie M. 2007. Touch sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *Pflugers Arch.* 454 : 691—702.
- Bourque C. W., Oliet S. H. R. 1997. Osmoreceptors in the central nervous system. *Annu. Rev. Physiol.* 59 : 601—619.
- Burnstock G. 1999. Release of vasoactive substances from endothelial cells by shear stress and purinergic mechanosensory transduction. *J. Anat.* 194 : 335—342.
- Canessa C. M., Horisberger J. D., Rossier B. C. 1993. Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration. *Nature (Lond.)* 361 : 467—470.
- Canessa C. M., Merillat A. M., Rossier B. C. 1994. Membrane topology of the epithelial sodium channel in intact cells. *Amer. J. Physiol.* 267 : 1682—1690.
- Carattino M. D., Sheng S., Kleyman T. R. 2003. Epithelial Na⁺ channels are activated by laminar shear stress. *J. Biol. Chem.* 279 : 4120—4126.
- Carattino M. D., Sheng S., Kleyman T. R. 2005. Mutations in the pore region modify epithelial sodium channel gating by shear stress. *J. Biol. Chem.* 280 : 4393—4401.
- Carnally S. M., Dev H. S., Stewart A. P. 2008. Direct visualization of the trimeric structure of the ASIC1a channel, using AFM imaging. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372 : 752—755.
- Chalfie M., Au M. 1989. Genetic control of differentiation of the *C. elegans* touch receptor neurons. *Science*. 243 : 1027—1033.
- Chang S. S., Grunder S., Hanukoglu A., Rosler A., Mathew P. M. 1996. Mutations in subunits of the Epithelial Sodium Channel cause salt wasting with hyperkalaemic acidosis, pseudohypoadosteronism type 1. *Nat. Genet.* 12 : 248—253.
- Chapleau M. W. 1992. Cardiovascular mechanoreceptors. *Adv. Comp. Environ. Physiol.* 10 : 138—164.
- Driscoll M., Chalfie M. 1991. The *mec-4* gene is a member of a family of *C. elegans* genes that can mutate to induce neuronal degeneration. *Nature*. 349 : 588—593.
- Drummond H. A., Gebremedhin D., Harder D. R. 2004. Degenerin/epithelial Na⁺ channel proteins: components of a vascular mechanosensor. *Hypertension*. 44 : 643—648.
- Drummond H. A., Welsch M. J., Abboud F. M. 2001. ENaC subunits are molecular components of the arterial baroreceptor complex. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 234 : 42—47.
- Duncan R. L., Turner C. H. 1995. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif. Tissue. Int.* 57 : 344—358.
- Eaton D. C., Hamilton K. L. 1988. The amiloride-blockable sodium channel of epithelial tissue. In: *Ion channels*. New York; London: Plenum Press. 251—282.
- Emtage L., Gu G., Hartwig E., Chalfie M. 2004. Extracellular proteins organize the mechanosensory channel complex in *C. elegans* touch receptor neurons. *Neuron*. 44 : 795—807.
- Fronius M., Clauss W. G. 2008. Mechano-sensitivity of ENaC: may the (shear) force be with you. *Eur. J. Physiol.* 455 : 775—785.
- Garty H. 1994. Molecular properties of epithelial amiloride-blockable Na⁺ channels. *FASEB J.* 8 : 0522—0528.
- Garty H., Palmer L. G. 1997. Epithelial sodium channel: functions, structure, regulation. *Physiol. Rev.* 77 : 359—396.
- Giebisch G. 1998. Renal potassium transport: mechanisms and regulation. *Amer. J. Physiol.* 274 : 817—833.
- Hackney C. M., Furness D. M. 1995. Mechanotransduction in vertebrate hair cells: structure and function of the stereociliary bundle. *Amer. J. Physiol.* 268 : 1—13.
- Hamill P., Martinac B. 2001. Molecular basis of mechanotransduction in living cells. *Physiol. Rev.* 81 : 685—740.
- Hamill O. P., Marty A., Neher E., Sackman B., Sigworth F. J. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391 : 85—100.
- Hamill O. P., McBride D. W. jr. 1996. The pharmacology of mechanogated membrane ion channels. *Pharmacol. Rev.* 48 : 231—252.
- Hill W. G., An B., Johnson J. P. 2002. Endogenously expressed epithelial sodium channel is present in lipid rafts in A6 cells. *J. Biol. Chem.* 277 : 33 541—33 544.
- Howard J., Roberts W. M., Hudspeth A. J. 1988. Mechanoelectrical transduction by hair cells. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 17 : 99—124.

- Huang M., Chalfie M. 1994. Gene interactions affecting mechanosensory transduction in *C. elegans*. *Nature*. 311 : 538—544.
- Hughey R. P., Bruns J. B., Kinlough C. L., Harkleroad K. L., Tong Q., Carattino M. D., Johnson J. P., Stockand J. D., Kleyman T. R. 2004. ENaCs are activated by furin-dependent proteolysis. *J. Biol. Chem.* 279 : 48 491—48 494.
- 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.
- Ismailov I. I., Berdiev B. K., Shlyonsky V. G., Benos D. J. 1997. Mechanosensitivity of an epithelial Na⁺ channel in planar lipid bilayers: release from Ca²⁺ block. *Biophys. J.* 72 : 1182—1192.
- Ji H. L., Fuller C. M., Benos D. J. 1998. Osmotic pressure regulates alpha beta gamma-rENaC expressed in *Xenopus* oocytes. *Amer. J. Physiol.* 275 : 1182—1190.
- Kellenberger S., Schild L. 2002. Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiol. Rev.* 82 : 735—767.
- Kizer N., Guo X.-L., Hruska K. 1997. Reconstitution of stretch-activated cation channels by expression of the α -subunit of the epithelial sodium channel cloned from osteoblasts. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 94 : 1013—1018.
- Kumada N., Terui N., Kuwaki T. 1990. Arterial baroreceptor reflex: its central and peripheral neural mechanisms. *Progr. Neurobiol.* 35 : 331—361.
- Kung C. 2005. A possible unifying principle for mechanosensation. *Nature*. 436 : 647—654.
- Linguaglia E., Voilley R. 1993. Expression cloning of an epithelial amiloride-sensitive sodium channel. *FEBS Lett.* 318 : 95—99.
- Ma H. P., Li L., Zhou Z. H., Eaton D. C., Warnock D. G. 2002. ATP masks stretch activation of epithelial sodium channels in A6 distal nephron cells. *Amer. J. Physiol.* 282 : 501—505.
- Morimoto T., Liu W., Woda C., Carattino M. D., Wei Y., Hughey R. P., Apodaca G., Satlin L. M., Kleyman T. R. 2006. Mechanism underlying flow stimulation of sodium absorption in mammalian collecting duct. *Amer. J. Physiol.* 291 : 663—669.
- Muto S. 2001. Potassium transport in mammalian collecting duct. *Physiol. Rev.* 81 : 85—116.
- Nakamura F., Strittmatter S. M. 1996. P2y1, purinergic receptors sensory neurons: contribution to touch-induced impulse generation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 93 : 10 465—10 470.
- Nilius B., Eggermont J., Voets T., Buyse G., Manolopoulos V., Droogmans G. 1997. Properties of volume-regulated anion channels in mammalian cells. *Progr. Biophys. Mol. Biol.* 68 : 69—119.
- Okada Y. 1997. Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl₂ channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor. *Amer. J. Physiol.* 273 : 755—789.
- Palmer L. G. 1992. Epithelial Na channels: function and diversity. *Annu. Rev. Physiol.* 54 : 51—66.
- Palmer L. G., Frindt G. 1996. Gating of Na channels in the rat cortical collecting tubule: effects of voltage and membrane stretch. *J. Gen. Physiol.* 107 : 35—45.
- Rossier B. C. 1998. Mechanosensitivity of the Epithelial Sodium Channel (ENaC): controversy or pseudocontroversy? *J. Gen. Physiol.* 112 : 95—96.
- Satlin L. M., Sheng S., Craig B., Woda C. B., Kleyman T. 2001. Epithelial Na⁺ channels are regulated by flow. *Amer. J. Physiol.* 280 : 1010—1018.
- 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.
- Shepherd J. T., Mancina G. 1986. Reflex control of the human cardiovascular system. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 105 : 3—99.
- Shlyonsky V. G., Mies F., Saribian-Sohraby S. 2003. Epithelial sodium channel activity in detergent-resistant membrane microdomains. *Amer. J. Physiol.* 284 : 182—188.
- Statuschenko A., Adams E., Booth R. E., Stockand J. D. 2005. Epithelial Na⁺ channel subunit stoichiometry. *Biophys. J.* 88 : 3966—3975.
- Tavernarakis N., Driscoll M. 2000. *Caenorhabditis elegans* degenerins and vertebrate ENaC ion channels contain an extracellular domain related to venom neurotoxins. *J. Neurogenet.* 13 : 257—264.
- Wan X., Juranka P., Morris C. E. 1999. Activation of mechanosensitive currents in traumatized membrane. *Amer. J. Physiol.* 276 : 318—327.
- Wu L., Gao X. 2007. Dual role of the TRPV channel as a sensor of flow and osmolality in renal epithelial cells. *Amer. J. Physiol.* 293 : 1699—1713.

Поступила 19 III 2009

MECHANOSENSITIVITY OF CATIONIC CHANNELS OF DEG/ENaC FAMILY

D. V. Vachugova,¹ E. A. Morachevskaya

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; ¹ e-mail: tarja.vdv@gmail.com

The presented article is aimed to review modern insights into the possible role of epithelial sodium channels (ENaCs) of the DEG/ENaC family in mechanosensitivity of cells. Contradictory results gained during previous years at the study of native channels in the cells of renal epithelium and channels overexpressed in different model systems are discussed. The variety of methods used to reveal channel mechanosensitivity is specially reviewed. We have also focused our attention on the explanation of the functional role of mechanosensitivity in polarized kidney cells. The data reviewed allow us to conclude that ENaC is a mechanosensitive channel which is activated in response to laminar shear stress of renal epithelial cells. Possible molecular basis of the ENaC activation by shear forces is discussed.

Key words: epithelial sodium channel, ENaC, degenerins, mechanosensitivity, mechanotransduction, polarized kidney cell.