

# **Изучение механизмов регуляции потенциал-зависимого натриевого канала Nav1.5 с целью поиска новых мишеней для терапии нарушений ритма**

## **Актуальность исследования**

Потенциал-зависимый натриевый канал  $Na_v1.5$  является важнейшим ионным каналом миокарда, ответственным за генерацию и проведение потенциала действия (ПД), а также аритмогенез. Мутации в *SCN5A* ( $Na_v1.5$ ) являются причиной возникновения наследственных аритмогенных синдромов. Регуляторами внутриклеточного везикулярного транспорта мембранных белков, в том числе ионных каналов, являются малые G-белки семейства Rho. В настоящее время Rho ГТФазы хорошо исследованы в сердечной сигнализации, в основном, в контексте гипертрофии миокарда и сердечной недостаточности, а также развития атриовентрикулярной блокады. Также в модуляции биофизических характеристик и локализации ионных каналов участвуют различные сигнальные ферменты протеинкиназы и фосфотазы. Так, показаны эффекты DMPK на потенциал-зависимые натриевые каналы скелетных мышц, однако вероятная регуляция  $Na_v1.5$  является совершенно неизученной областью. Данный проект является первым комплексным исследованием Rho- и DMPK-зависимой регуляции Nav1.5 на уровне модуляции функционально активного канала, внутриклеточного транспорта белковой порообразующей субъединицы и экспрессии гена *SCN5A*.

## **Научная платформа**

Кардиология и ангиология

## **Научные подразделения исполнители (с указанием руководителя исследования)**

Руководитель исследования – к.б.н., с.н.с. Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ "СЗФМИЦ им. В.А.Алмазова" Минздрава России Карпушев А.В.

Исполнители:

Институт молекулярной биологии и генетики ФГБУ «СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова»  
Минздрава России:

Группа клеточной биологии

НИЛ молекулярной кардиологии

НИЛ детской аритмологии

НИЛ нейромодуляции

НИО сердечной недостаточности

## **Ключевые слова**

потенциал-зависимый натриевый канал  $Na_v1.5$ , малые G-белки семейства Rho, протеинкиназа миотонической дистрофии DMPK, кардиомиоцит, сердечная патология

## **Цель проекта**

Исследовать молекулярные внутриклеточные механизмы Rho- и DMPK-зависимой регуляции активности сердечного натриевого канала  $Na_v1.5$  и проанализировать роль малых G-белков Rho семейства и протеинкиназы миотонической дистрофии DMPK в развитии сердечно-сосудистых заболеваний.

## **Задачи проекта**

1. Изучить эффекты экспрессии малых G-белков RhoA, Rac1 и Cdc42 и протеинкиназы DMPK дикого типа и мутантных форм на функциональные характеристики ионных токов потенциал-зависимого натриевого канала  $Na_v1.5$ , реконструированного в гетерологической экспрессионной системе.

2. Исследовать сигнальные каскады, опосредующие эффекты малых G-белков и DMPK на канал  $Na_v1.5$ .
3. Определить роль актиновых и тубулиновых филаментов цитоскелета и внутриклеточного везикулярного транспорта альфа-субъединицы канала  $Na_v1.5$  в модуляции натриевого тока малыми G-белками.
4. Изучить Rho-зависимую регуляцию экспрессии гена SCN5A, кодирующего порообразующую субъединицу канала  $Na_v1.5$ .

#### **Достигнутые результаты проекта**

В результате выполнения работ по теме проекта впервые получены данные по модуляции биофизических характеристик потенциал-зависимого натриевого канала  $Na_v1.5$  при коэкспрессии порообразующей субъединицы канала с малым G-белком RhoA. Проанализированы плотность тока, потенциал реверсии, параметры вольт-амперной кривой и кривых стационарной активации и инактивации. Было установлено достоверное увеличение плотности тока и смещение стационарных активации и инактивации в сторону гиперполяризации мембранного потенциала, т.е., показано, что RhoA усиливает функциональную активность натриевого канала и регулирует кинетику воротного механизма. Таким образом, RhoA-опосредованный сигнальный путь можно рассматривать как потенциальную фармакологическую мишенью при сердечно-сосудистых патологиях.

#### **Ожидаемые результаты проекта**

Продолжение работ по проекту предполагает получение новых данных о механизмах регуляции активности сердечного натриевого канала  $Na_v1.5$  малым G-белком RhoA и протеинкиназой DMPK. На основании полученных нами экспериментальных данных, а также литературных сведений планируется определить пути реализации эффектов сигнальных молекул, а также локализовать сайты белковой субъединицы ионного канала, взаимодействие с которыми опосредует эти эффекты.

Исследование влияния сигнального белка DMPK на работу ионного канала представляется очень перспективным направлением. В настоящее время имеется множество клинических данных о функциональных нарушениях в сердце (атриовентрикулярная блокада проведения, дисфункция синусного узла, фибрилляция предсердий и желудочковая тахикардия) у пациентов с миотонической дистрофией первого типа, связанной с мутациями в гене DMPK. Все перечисленные сердечные патологии обусловлены нарушениями в активности натриевого канала, однако молекулярные механизмы и сигнальные внутриклеточные каскады, связывающие DMPK и  $Na_v1.5$  не изучены.

Приоритетными в данном проекте будут данные о регуляции активности сердечного натриевого канала  $Na_v1.5$  малыми G-белками Rho семейства и протеинкиназой DMPK на уровне модуляции функционально активного канала на клеточной мембране, внутриклеточного транспорта белковой порообразующей субъединицы и экспрессии гена SCN5A.

Кроме того, будут идентифицированы и исследованы сигнальные пути и участие цитоскелета и везикулярного транспорта, посредством которых осуществляется Rho-зависимая регуляция работы ионного канала.

Комплексное исследование потенциал-зависимый натриевый канал  $Na_v1.5$  с использованием электрофизиологических, молекулярно-биологических и биохимических методик первое в существенно расширит фундаментальные представления о регуляции натриевого тока в сердечной мышечной ткани и внутриклеточных молекулярных механизмах развития сердечной патологии, а также позволит определить новые терапевтические мишени для снижения риска сердечно-сосудистых заболеваний.

## Назначение и предполагаемое использование (внедрение) результатов проекта

Данные, полученные в результате проведения исследований в рамках настоящего проекта позволят детально изучить и проанализировать молекулярные механизмы Rho- и DMPK-зависимой регуляции работы ионного канала  $Na_v1.5$  и будут иметь значение как для фундаментальной науки так и в прикладном плане, могут быть использованы для поиска терапевтических мишеней для снижения риска сердечно-сосудистых заболеваний.

## Описание научного исследования

В настоящее время сердечно-сосудистые заболевания удерживают лидирующую позицию в структуре смертности. Одними из ведущих причин развития сердечной патологии являются нарушения в работе ионных каналов кардиомиоцитов, каналопатии. Потенциал-зависимый натриевый канал  $Na_v1.5$  является важнейшим ионным каналом миокарда, ответственным за генерацию и проведение ПД. Значение  $Na_v1.5$  для нормальной сердечной функции подчеркивается описанием многочисленных мутаций в гене SCN5A, кодирующем порообразующую субъединицу  $Na_v1.5$ , связанных с различными заболеваниями, такими как синдром удлиненного интервала QT третьего типа (LQT3), синдром Бругада, идиопатическая вентрикулярная фибрилляция, ухудшенное предсердно-желудочковое проведение, прогрессивный сердечный дефект проведения через систему Гиса-Пуркинье и синдром слабости синусового узла. В то время как одни мутации изменяют биофизические характеристики ионного канала, такие как потенциал-зависимая активация, скорость инактивации, и таким образом являются причиной формирования нефункционального канала, другие мутации связаны с нарушением взаимодействия порообразующей субъединицы с ассоциированными с ней регуляторными белками, в частности, регулирующими внутриклеточный транспорт и положение на мембране канала. Показано, что для таких патологий как синдром Бругада и атриовентрикулярная блокада проведения причиной возникновения являются именно мутации в SCN5A, отвечающие за нарушение транслокации канала  $Na_v1.5$ .

На сегодняшний день существует множество научных данных по регуляции активности ионных каналов малыми G-белками, в том числе белками Rho-семейства и список подобных работ непрерывно растет. Rho белки участвуют в регуляции экспрессии генов и реорганизации цитоскелета и хорошо исследованы в сердечной сигнализации, в основном, в контексте гипертрофии миокарда и сердечной недостаточности, а также развития атриовентрикулярной блокады. Наиболее изученными белками Rho семейства являются RhoA, Rac1 и Cdc42. Однако регуляция активности сердечного натриевого канала малыми G-белками RhoA, Rac1 и Cdc42 является совершенно неизученной областью. Поэтому наш проект имеет большое значение в понимании Rho-зависимой регуляции работы  $Na_v1.5$  на уровне модуляции функционально активного канала, внутриклеточного транспорта белковой порообразующей субъединицы и экспрессии гена SCN5A.

Клинические данные о функциональных нарушениях в сердечной мышце (атриовентрикулярная блокада проведения, дисфункция синусового узла, фибрилляция предсердий и желудочковая тахикардия) у пациентов с миотонической дистрофией первого типа свидетельствуют о тесной взаимосвязи этого синдрома с нарушениями в работе сердечного натриевого канала. Развитие миотонической дистрофии первого типа связано с мутациями в гене сигнальной протеинкиназы DMPK. DMPK обладает высокой степенью идентичности по отношению к Rho-киназам, основным эффекторам Rho белков. Показаны эффекты DMPK на потенциал-зависимые натриевые каналы скелетных мышц, однако молекулярные механизмы и сигнальные внутриклеточные каскады регуляции  $Na_v1.5$  остаются на сегодняшний день совершенно неисследованной областью.

Изучение эффектов малых G-белков семейства Rho и киназы DMPK на активность канала  $Na_v1.5$  и сигнальных путей, опосредующих эти эффекты расширит фундаментальные представления о регуляции потенциал-зависимого натриевого канала и о молекулярных механизмах развития сердечной патологии, а также позволит определить новые терапевтические мишени для снижения риска сердечно-сосудистых заболеваний.

## Описание научных подходов и методов, используемых для решения поставленных задач

В работе по проекту для решения поставленных научных задач используются следующие методики.

1. Исследование функциональных характеристик ионных токов потенциал-зависимого натриевого канала  $Na_v1.5$  выполняется с помощью метода локальной фиксации потенциала (patch-clamp) в конфигурации whole cell («целая клетка»). Работа проходит на клетках линии CHO (Chinese Hamster Ovary cells).

CHO – иммортализованная линия эпителиальных клеток яичников китайского хомячка *Cricetulus griseus*. Культивирование в среде DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной сыворотки коровы Nu Clone, антибиотика пенициллин-стрептомицина (100 мкг/мл) и L-глутамин (2 mM) при 5%  $CO_2$  и +37°C. Клетки трансфицируются с использованием реагента Lipofectamine (Invitrogen, США) плазмидой, содержащей ген SCN5A. Маркером успешной трансфекции является белок GFP, пришитый к белку канала, характеристики канала при этом не изменяются. Метод использования клеток CHO в качестве гетерологической экспрессионной системы общепринят в исследованиях подобного рода.

В нашей лаборатории имеется коллекция плазмид с генами, кодирующими малые G-белки Rho семейства: RhoA, Rac1 и Cdc42 и киназу DMPK дикого, постоянно-активного и доминантно-негативного типов. Трансфекция этих плазмид позволит оценить эффекты сигнальных молекул на сердечный натриевый канал.

2. Для исследования сигнальных каскадов, опосредующих эффекты малых G-белков будет применяться инкубация клеток в присутствии блокаторов внутриклеточных сигнальных каскадов (KT 5720, дигидрохлорид H 89 - блокаторы протеинкиназы A, Go 6983 - протеинкиназы C, Y27632 – Rho-киназы, LY294002 – PI3 киназы, U-73122 – фосфолипазы C и др. (Tocris, США)).

Регуляция токов ионных каналов обуславливается двумя фундаментальными механизмами: изменение биофизических характеристик - активации и инактивации канала и изменение общего количества каналов на мембране. В свою очередь, последний механизм может регулироваться как на уровне экспрессии генов, так и на уровне транспорта белковых субъединиц к наружной мембране или их интернализации. Электрофизиологическая часть работы позволит нам изучить активационные и инактивационные характеристики и плотность тока, а для исследования регуляции на уровне экспрессии и транспорта будут использованы следующие подходы.

3. Аппликация на клетки цитохалазина (блокатор полимеризации актиновых филаментов), колхицина (ингибитор полимеризации тубулина) брефелдина А (ингибитор антероградного везикулярного транспорта) или дайносор (блокатор динамин-зависимого эндоцитоза) позволит определить роль цитоскелета и внутриклеточного транспорта ионного канала в модуляции натриевого тока малыми G-белками.

4. Для выяснения регуляции экспрессии альфа-субъединицы канала  $Na_v1.5$  будут выделены из лизата клеток РНК с помощью TRI реагента (Sigma-Aldrich, США) для получения кДНК методом обратной транскрипции и для постановки количественной ПЦР в реальном времени и белков для электрофореза в полиакриламидом геле по Лэммли (SDS PAGE) и белкового иммуноблота (Western-blot). Для более детальной оценки экспрессии канала на белковом уровне будет выполнено разделение экстрагируемого белка на мембранную и цитозольную фракции. Использование блокаторов транскрипции и трансляции – актиномицина и циклогексимида позволит детально изучить регуляцию экспрессии  $Na_v1.5$ .