

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ В КЛЕТКАХ K562

© A. B. Сударикова,^{1,*} И. О. Васильева,¹ Е. А. Морачевская,¹ Ю. А. Негуляев^{1, 2}

**¹ ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,
и ² Кафедра физико-химической биологии клетки С.-Петербургского государственного
политехнического университета;**

*** электронный адрес: anastasia.sudarikova@gmail.com**

В настоящей работе проведена функциональная и молекулярная идентификация потенциалнезависимых натриевых каналов в клетках миелоидной лейкемии человека K562, в частности проверены предположения относительно их принадлежности к семейству DEG/ENaC (дегенерины/эпителиальные натриевые каналы). Методом ОТ-ПЦР в клетках K562 показана экспрессия субъединиц α , β , и γ -канала hENaC. С помощью различных вариантов метода патч-кламп изучены биофизические характеристики натриевых каналов, проанализировано действие диуретика амилорида. В натриевом растворе (145 mM Na^+) исследуемые каналы имели проводимость около 12 pСм. Установлено, что они непроницаемы для двухвалентных катионов (Ca^{2+} и Mg^{2+}) и не блокируются амилоридом. При этом важно отметить, что отсутствие амилорид-чувствительной компоненты показано как на уровне одиночных каналов, так и на уровне интегрального натриевого тока. Полученные результаты позволяют полагать, что амилорид-нечувствительные натриевые каналы в клетках K562 принадлежат к семейству ENaC.

Ключевые слова: плазматическая мембрана, потенциалнезависимые натриевые каналы, амилорид, клетки лейкемии человека, эпителиальные натриевые каналы ENaC.

В настоящее время сформировались представления о семействах потенциалнезависимых (non-voltage-gated) ионных каналов клеточных мембран, общим свойством которых является отсутствие потенциалуправляемого воротного (gating) механизма. Такие каналы, характеризующиеся натриевой селективностью, были названы потенциалнезависимыми натриевыми каналами (Ведерникова и др., 1999). Они были обнаружены в транспортных эпителиях, а также в гладкомышечных клетках (Van Renterghem, Lazdunski, 1991), перитонеальных макрофагах (Negulyaev, Vedernikova, 1994), клетках карциномы A431 (Negulyaev et al., 1994), лимфомы U937 и миелоидной лейкемии K562 (Ведерникова и др., 1997). Кроме того, клетки K562 оказались удобной моделью для изучения путей активации каналов в электроневозбудимых клетках, в частности с участием цитоскелета. Было показано, что активность каналов определяется состоянием и динамикой субмембранныго актина (Negulyaev et al., 2000; Shumilina et al., 2003). Однако молекулярная природа потенциалнезависимых натриевых каналов до сих пор не установлена.

Судя по имеющимся данным, Na-селективные каналы в различных электроневозбудимых клетках, в том числе в клетках K562, могут быть близки к каналам семейства DEG/ENaC (дегенерины/эпителиальные натриевые каналы) (Ведерникова и др., 1999; Kellenberger, Shild, 2002). Как известно, некоторые каналы семейства DEG/ENaC проводят двухвалентные катионы, в частности каналы ASIC1a (Yermolaieva et al., 2004) и MEC-4 (Bianchi et al., 2004). Это отличает их от остальных членов семейства

DEG/ENaC, в частности эпителиальных натриевых каналов ENaC (Kellenberger et al., 1999, 2008). Проницаемость для двухвалентных катионов характерна для каналов семейства TRP (Nilius et al., 2007), а также для механочувствительных каналов, ранее обнаруженных в клетках K562 (Staruschenko, Vedernikova, 2002; Staruschenko et al., 2006). Для рассматриваемых натриевых каналов вопрос о проницаемости для Ca^{2+} оставался неясным, а проницаемость для Mg^{2+} ранее не исследовали.

Отличием обнаруженных каналов от эпителиальных каналов ENaC является низкая чувствительность к амилориду и его аналогам. Первоначально именно блокирование амилоридом рассматривали как идентификационный признак каналов ENaC и всего семейства. В последнее время появились данные о каналах, гомологичных ENaC, но имеющих низкую чувствительность к амилориду, возможная функциональная роль которых обсуждается в связи с изучением транспорта ионов в эпителии легких (Folkesson, 2008; O'Brodovich et al., 2008). В отличие от каналов почечного эпителия вопрос о принадлежности к семейству ENaC натриевых каналов, обнаруженных в других специализированных тканях и клетках, остается открытым.

Задача настоящей работы заключалась в идентификации потенциал-независимых натриевых каналов в клетках K562. С использованием электрофизиологических подходов и анализа данных ОТ-ПЦР проверяли предположения о принадлежности каналов к семейству DEG/ENaC. Анализировали действие амилорида на одиночные каналы и интегральные натриевые токи, а также исследовали проницаемость каналов для Ca^{2+} и Mg^{2+} .

Материал и методика

Клетки миелоидной лейкемии человека K562, полученные из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН, культивировали на среде RPMI-1640 с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и 80 мкг/мл гентамицина. За 1—3 ч до экспериментов клетки высевали на покровные стекла размером 4×4 мм, предварительно покрытые L-полиэтиленом.

С помощью метода локальной фиксации потенциала (патч-кламп) регистрировали ионные токи через одиночные каналы на участке мембраны нативной клетки (конфигурация cell-attached) и в изолированном фрагменте мембранны (outside-out). При отведении сигнала «от целой клетки» (whole-cell) измеряли токи через всю клеточную мембрану. Трансмембранные ионные токи регистрировали с помощью высокоточного измерительного усилителя EPC8 (НЕКА, Германия). Пипетки изготавливали из стеклянных капилляров на горизонтальной микрорезнице P-97 (Sutter Instrument, США). Сопротивление пипеток, заполненных стандартным раствором, составляло около 3—4 МОм в режиме whole-cell и 5—15 МОм в остальных режимах. Мембранный потенциал определяли как потенциал раствора с внутренней стороны мембранны относительно наружного раствора.

Растворы. Стандартный наружный раствор содержал (мМ): 145 NaCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂ и 10 HEPES/TrisOH. При отведении cell-attached использовали калиевый внеклеточный раствор, содержащий (мМ): 140 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂ и 10 HEPES/KOH. Раствор, контактирующий с внутриклеточной стороной мембранны фрагмента, содержал (мМ): 140 аспартата калия (KAsp), 5 NaCl, 2 EGTA, 1 MgCl₂, 20 HEPES/TrisOH и соответствующее количество CaCl₂(0.176 мМ) для установления свободной концентрации ионов кальция на уровне 0.01 мкМ (pCa 8). При исследовании проницаемости каналов для двухвалентных катионов использовали наружные растворы с различными концентрациями Mg²⁺ (Ca²⁺) — 20, 10 и 2 мМ. Остальные катионы были заменены на непроникающие TRIS⁺ и N-метил-D-глюкомин (NMDG⁺). Величина pH всех растворов составляла 7.3.

Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция (OT-ПЦР). Общую РНК из клеток K562 выделяли с помощью гуанидин-тиоцианатного метода (Chomczynski, Sacchi, 1987). Обратную транскрип-

цию проводили с использованием MMLV-обратной транскриптазы (Силекс, Россия) согласно инструкции фирмы-изготовителя. ПЦР проводили с использованием полимеразы Hot-taq (Силекс, Россия, концентрация 5 ед./мкл), 0.5 мкМ прямых и обратных праймеров и 0.5—2 мкл кДНК. Праймеры для ПЦР были синтезированы согласно опубликованным последовательностям (Gamper et al., 2000). Праймеры для α -субъединицы ENaC (ген SCNN1A): прямой 5'-GGGTCTCCAGATGCTATCG-3', обратный 5'-AAGGACAGAGACATGGGGTG-3', размер продукта 376 п. н.; праймеры для β -субъединицы ENaC (ген SCNN1B): прямой 5'-AATACTGCAACAACGGG-AC-3', обратный 5'-GATCTCCCCAA-ACTCGATGA-3', размер продукта 392 п. н.; праймеры для γ -субъединицы ENaC (ген SCNN1G): прямой 5'-AGATGGTGGAGAAAT-GTGGG-3', обратный 5'-ATACTGTTGGCTGGGCTC-TC-3', размер продукта 367 п. н. Условия амплификации: 94 °C — 9 мин 30 с, затем 38 циклов (94 °C — 30 с, 58 °C — 40 с, 72 °C — 40 с) и 72 °C — 5 мин. Продукты ПЦР электрофоретически разделяли в 6%-ном полиакриламидном геле, окрашивали бромистым этидием и фотографировали при ультрафиолетовом облучении.

Результаты

Функциональную идентификацию потенциалнезависимых натриевых каналов в клетках K562 проводили с использованием различных вариантов метода патч-кламп. В контрольных условиях унитарные токи измеряли в присутствии натрия (145 мМ Na⁺) как основного проникающего катиона в растворе с внеклеточной стороны мембранны. На рис. 1 представлен пример высокой фоновой активности каналов в участке мембраны нативной клетки (cell-attached). Проводимость (11—13 пСм) и потенциал реверсии (20—25 мВ) натриевых каналов сходны с этими характеристиками, полученными ранее в экспериментах на клетках K562 (Ведерникова и др., 1997; Сударикова и др., 2009).

В экспериментах с заменой ионов во внешнем растворе (конфигурация outside-out) исследовали проницаемость натриевых каналов в клетках K562 для двухвалентных катионов (Ca²⁺, Mg²⁺) в диапазоне концентраций 2—20 мМ. Раствор в пипетке, имитирующей внутриклеточный, содержал 140 мМ KAsp в качестве основного электролита. Для поддержания тоничности и ионной

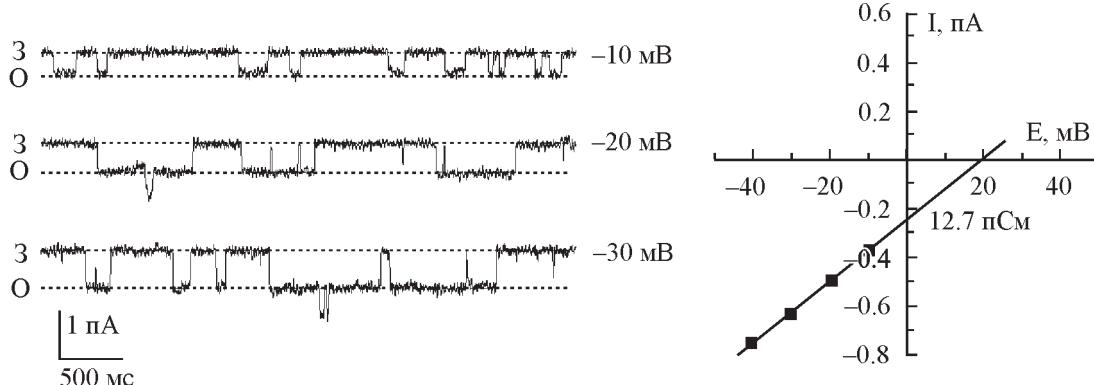


Рис. 1. Активность натриевых каналов в эксперименте патч-кламп на участке мембраны нативной клетки (вариант cell-attached). Записи токов при различных значениях мембранныго потенциала и вольт-амперная характеристика натриевых каналов в клетках K562. Значение проводимости каналов составляет 12.7 пСм. 3 — закрытое, O — открытое состояния каналов.

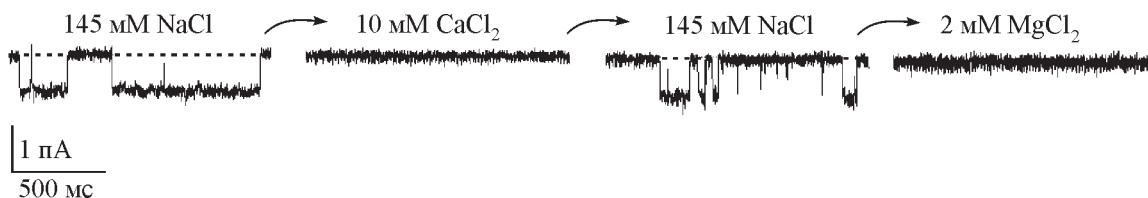


Рис. 2. Проницаемость каналов для ионов кальция и магния.

Записи токов в контролльном Na-содержащем растворе (145 mM NaCl) и при последовательных заменах наружного раствора; эксперимент на изолированном фрагменте мембранны (outside-out), поддерживаемый потенциал -40 мВ.

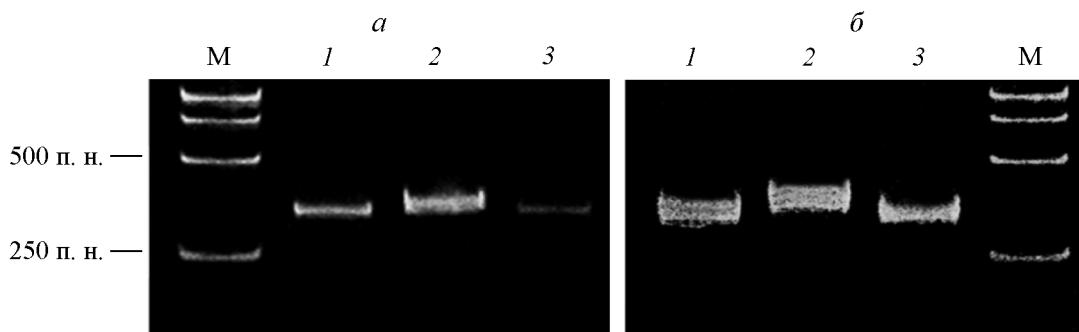


Рис. 3. Экспрессия α-, β- и γ-субъединиц hENaC в клетках K562.

Электрофореграммы продуктов ПЦР, полученных на ДНК клеток K562 (a) и HEK293 (б) с праймерами, специфичными к субъединицам ENaC. Дорожки: 1 — α-hENaC (376 п. н.), 2 — β-hENaC (392 п. н.), 3 — γ-hENaC (367 п. н.), М — маркер длин фрагментов ДНК.

силы наружных растворов, содержащих 2 mM MgCl₂, или 20 mM MgCl₂, или 10 mM CaCl₂, остальные катионы были заменены на непроникающие катионы TRIS⁺ и NMDG⁺. Активность натриевых каналов наблюдали в 40 % экспериментов ($n = 32$). На рис. 2 представлен один из экспериментов (outside-out), в котором проведено несколько последовательных смен раствора с внешней стороны мембранны. Показано, что токи, регистрируемые в контролльном Na-содержащем растворе, обратимо устраивались при замене ионов Na⁺ на ионы Mg²⁺ или Ca²⁺ ($n = 14$) в различных концентрациях (2—20 mM).

Таким образом, натриевые каналы в клетках K562 не-проницаемы для двухвалентных катионов как при физиологических (1—2 mM), так и при более высоких (10—20 mM) концентрациях. Судя по таким биофизическим характеристикам, как проводимость, селективность, кинетические свойства, обнаруженные каналы близки к каналам ENaC. Возникает вопрос относительно их идентификации на молекулярном уровне.

Экспрессию α-, β- и γ-hENaC в клетках K562 оценивали методом ОТ-ПЦР с праймерами, специфичными к генам SCNN1A (α-субъединицы hENaC) и SCNN1B (β-субъединицы hENaC) и SCNN1G (γ-субъединицы hENaC). Размеры продуктов амплификации соответствовали расчетным (рис. 3 a), а также размерам, полученным на используемых в качестве положительного контроля клетках линии HEK293, трансформированных плазмидами, кодирующими три субъединицы hENaC (рис. 3, б). Как показывают результаты ОТ-ПЦР, в клетках K562 экспрессируются α-, β- и γ-субъединицы эпителиального натриевого канала ENaC (рис. 3).

Оценка чувствительности натриевых каналов к амилориду. Ранее сообщалось об отсутствии

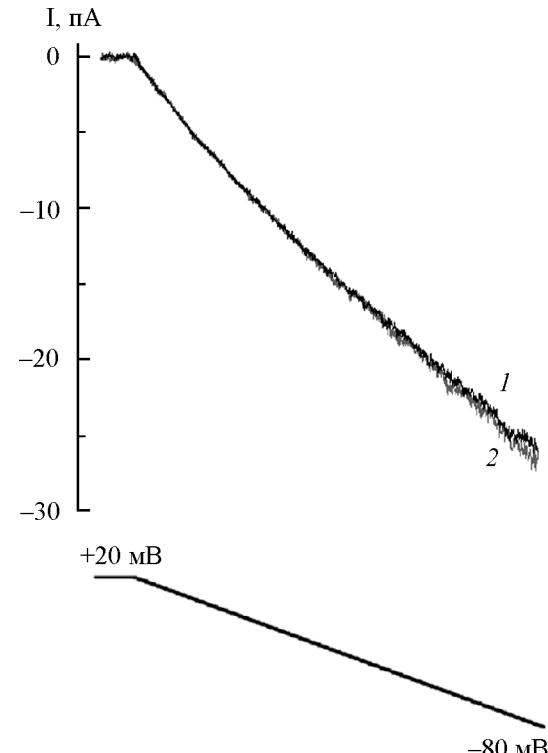


Рис. 4. Действие амилорида на натриевые токи в клетках K562 в эксперименте whole-cell.

Регистрация интегральных токов до (кривая 1) и после (кривая 2) добавления амилорида в наружный раствор (0.1 или 0.01 mM амилорида; записи токов совпадают). Внизу — протокол подачи пилообразного напряжения.

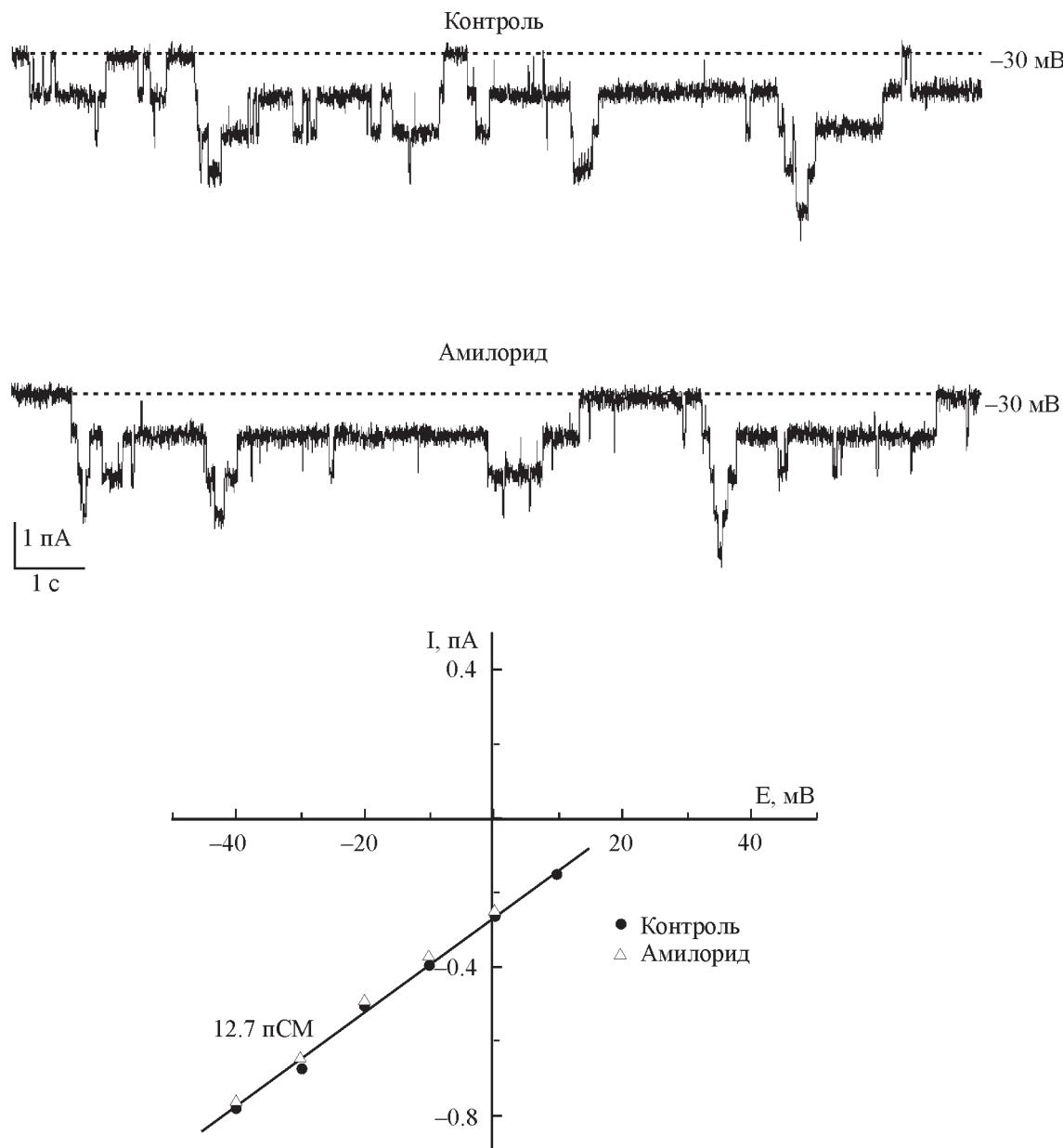


Рис. 5. Амилорид-нечувствительные натриевые каналы в клетках K562.

Записи токов через одиночные каналы в эксперименте на «целой клетке» (whole-cell) до (контроль) и после подачи амилорида в наружный раствор; внизу — соответствующие вольт-амперные характеристики.

специфического ингибирования исследуемых натриевых каналов амилоридом, который считается блокатором эпителиальных каналов ENaC (Веденникова и др., 1997). Поэтому мы проверили действие амилорида на натриевые токи в клетках K562 с помощью различных вариантов метода патч-кламп. Для ответа на вопрос о том, присутствует ли амилорид-чувствительная компонента в составе трансмембранных токов, провели эксперименты в варианте регистрации токов от всей мембраны клетки (whole-cell). Так как известно, что натриевые каналы в клетках K562 активируются при разборке актинового цитоскелета (Negulyaev et al., 2000; Shumilina et al., 2003), в части опытов для повышения суммарной активности каналов использовали цитохалазин D. На рис. 4 представлена запись трансмембранного тока в ответ на подачу пилообразного напряжения (от +20 до -80 мВ). Добавление ами-

лорида в концентрации 0.01 или 0.1 мМ не приводило к существенному изменению тока (кривые, полученные в контроле и после подачи амилорида в различных концентрациях, практически совпадают). Таким образом, на уровне интегральных токов мы не выявили компоненты, которая могла бы отражать активность амилорид-чувствительных натриевых каналов ENaC в клетках K562.

В следующих сериях экспериментов исследовали влияние амилорида на работу одиночных каналов, в том числе при отведении от «целой клетки» (вариант whole-cell). Проведение таких измерений возможно в случае относительно небольшого числа каналов в клеточной мембране и при образовании сверхплотного контакта между регистрирующей пипеткой и плазматической мембраной. Результаты типичного опыта показаны на рис. 5. Регистрировали активность одиночных каналов до и по-

сле апликации амилорида (0.1 мМ) к внешней поверхности мембранны. Наблюдали по крайней мере 4 устойчивых уровня, соответствующих функционированию 4 каналов. Амилорид в концентрации 0.01 или 0.1 мМ не оказывал влияния на амплитуду и кинетику открываний и (или) закрываний каналов.

Отсутствие ингибирующего действия амилорида на натриевые токи было показано и в экспериментах на изолированных фрагментах мембран (вариант outside-out), что согласуется с предшествующими результатами (Веденникова и др., 1997). Биофизические свойства натриевых каналов после обработки амилоридом (outside-out) были близки к контрольным, а также к полученным в опытах whole-cell, проводимость составляла $11\text{--}13 \text{ пСм}$. Важно отметить, что в экспериментах whole-cell выявляются только амилорид-нечувствительные натриевые каналы (рис. 4, 5), вероятно принадлежащие к семейству ENaC.

Обсуждение

В наших экспериментах были проверены предположения о молекулярной природе потенциалнезависимых натриевых каналов, в частности их принадлежности к суперсемейству катионных каналов DEG/ENaC. Первой задачей была точная идентификация исследуемых натриевых каналов по проводимости и селективности. Каналы DEG/ENaC характеризуются вариабельностью данных характеристик, и в первую очередь это касается такого важнейшего критерия, как проницаемость для двухвалентных катионов. Так, показано, что механочувствительные каналы MEC-4 (в комплексе с MEC-10), протонуправляемые каналы ASIC1a (Yermolaieva et al., 2004; Xiong et al., 2006) и в меньшей степени ASIC1b (Bassler et al., 2001; Xiong et al., 2006) проницают для ионов Ca^{2+} (Bianchi et al., 2004). При этом надо отметить, что методом ОТ-ПЦР показана экспрессия ASIC1a (*ACCN2*) в клетках K562 (Foller et al., 2006). В то же время известно, что большинство представителей семейства DEG/ENaC не проводят двухвалентные катионы, в частности эпителиальные натриевые каналы ENaC (Kellenberger et al., 1999). Проницаемость для ряда двухвалентных катионов характерна также для потенциалнезависимых катионных каналов семейства TRP (Nilius et al., 2007).

В нашей работе корректная оценка проводимости и проницаемости исследуемых каналов для Ca^{2+} и Mg^{2+} имела первостепенное значение для их функциональной идентификации. Полученные нами данные указывают на сходство селективных свойств потенциалнезависимых натриевых каналов с каналами ENaC. Наши эксперименты позволили на уровне функциональных характеристик четко отделить исследуемые натриевые каналы от механочувствительных каналов, ранее также идентифицированных в клетках K562 (Staruschenko, Vedernikova, 2002) и, возможно, принадлежащих к семейству DEG/ENaC или TRP.

Обобщая полученные результаты, можно заключить, что исследуемые натриевые каналы близки к типичным каналам ENaC эпителия почки, за исключением чувствительности к амилориду. В то же время результаты данной работы полностью согласуются с данными фармакологического тестирования каналов в гладкомышечных клетках (Van Renterghem, Lazdunski, 1991), макрофагах (Negulyaev, Vedernikova, 1994), клетках A431 (Negulyaev et al.,

1994) и K562 (Веденникова и др. 1997) и с очевидностью указывают на то, что амилорид не относится к селективным блокаторам потенциалнезависимых натриевых каналов, которые в этом случае можно назвать амилорид-нечувствительными. Поскольку ингибирование ионных токов амилоридом или его производными традиционно рассматривалось как главный критерий, доказывающий принадлежность каналов к семейству ENaC, вопрос относительно идентификации потенциалнезависимых натриевых каналов до настоящей работы оставался открытым.

С помощью ОТ-ПЦР мы показали экспрессию субъединиц α , β и γ hENaC в клетках K562. Эти результаты согласуются с данными японских авторов (Mirshahi et al., 2000), показавшими экспрессию α -субъединицы ENaC в различных клеточных линиях лейкемии человека. Однако в наших электрофизиологических экспериментах натриевые токи не ингибировались амилоридом. Другими словами, в плазматической мемbrane клеток K562 выявляются только натриевые каналы, не обладающие чувствительностью к амилориду. Опираясь на функциональные характеристики и результаты ОТ-ПЦР-анализа, мы можем полагать, что субъединицы ENaC формируют амилорид-нечувствительные натриевые каналы в клетках K562. Дополнительные аргументы в пользу этого заключения могли бы быть получены с использованием методов иммунофлуоресценции, однако антитела к ENaC недостаточно специфичны. Следует отметить, что одним из полезных итогов нашей работы на клетках K562 является экспериментальная модель, позволяющая регистрировать интегральные токи в экспериментах whole-cell. В перспективе это позволит использовать методы избирательной инактивации генов для однозначной идентификации натриевых каналов.

Наши выводы согласуются с данными о каналах, гомологичных DEG/ENaC и имеющими низкую чувствительность к амилориду (Ugawa et al., 2003; O'Brodovich et al., 2008). Функциональная роль амилорид-нечувствительных каналов A-ENaC (атипичных) обсуждается в связи с изучением транспорта ионов в эпителии легких (Folkesson, 2008; O'Brodovich et al., 2008). Утрата чувствительности к действию блокатора может объясняться точечными мутациями в участке связывания канала с амилоридом (см., например: Kellenberger et al., 2003). Так, методом направленного мутагенеза было показано, что замена остатков глицина в β - и γ -субъединицах ENaC (βGly525 и γGly542) снижает степень ингибирования амилоридом более чем в 1000 раз (Schild et al., 1997).

Механизмы, лежащие в основе нечувствительности атипичных каналов ENaC к амилориду, могут быть также связаны с особенностями стехиометрии субъединиц. Так, подавление экспрессии α - или β -субъединицы ENaC в легочном эпителии крысы приводило к снижению чувствительности транспорта натрия к амилориду (Li, Folkesson, 2006; Randrianarison et al., 2007). Кроме того, в альвеолярных клетках I и II типов обнаружены неселективные катионные каналы с проводимостью $19\text{--}21 \text{ пСм}$, отсутствием избирательности Na/K и отсутствием специфического ингибирования амилоридом (в клетках II типа $K_{1,5}$ составляет около 1 мМ). Исследователи предположили, что эти каналы образованы α -субъединицами ENaC (Johnson et al., 2006; Randrianarison et al., 2007). Сообщается, что в В-лимфоцитах альдостерон активирует каналы с проводимостью 10 пСм , отношением проницаемостей $P_{\text{Na}}/P_{\text{K}} = 3$ и пониженной чувствительностью к амилориду (Ma et al., 2004). По мнению авторов, эти каналы сформи-

рованы α - и β -субъединицами ENaC. Их предположения подтверждены с помощью трансфекции экзогенной γ -субъединицы ENaC, которая приводила к формированию традиционного амилорид-чувствительного канала ENaC с проводимостью 5 пСм и высокой натриевой селективностью ($P_{Na}/P_K = 20$).

Как показано в серии работ на клетках K562, отличительной особенностью исследуемых каналов является активация и инактивация, контролируемая сборкой и разборкой микрофиламентов (Negulyaev et al., 2000). В последние годы наблюдается повышенный интерес к возможному участию цитоскелета в функционировании каналов ENaC. В целом наблюдаемый феномен роста активности натриевых каналов клеток K562 при разборке актинового цитоскелета (при действии цитохалазина) близок к эффектам, описанным для натриевых каналов апикальных мембран почечного эпителия ENaC (Cantiello et al., 1991; Prat et al., 1993; Karpushev et al., 2010). Это можно рассматривать как еще один аргумент в пользу общности молекулярной природы потенциалнезависимых натриевых каналов реабсорбирующих эпителиев и клеток K562.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-00995-а), программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и правительства Санкт-Петербурга (2010 г.).

Список литературы

- Ведерникова Е. А., Максимов А. В., Негуляев Ю. А. 1997. Функциональные свойства и цитоскелетзависимая регуляция натриевых каналов в плазматической мембране лейкозных клеток. Цитология. 39 (12) : 1142—1151.
- Ведерникова Е. А., Максимов А. В., Негуляев Ю. А. 1999. Функциональная характеристика и молекулярная топология потенциалнезависимых натриевых каналов. Цитология. 41 (8) : 658—666.
- Сударикова А. В., Чубинский-Надеждин В. И., Негуляев Ю. А., Морачевская Е. А. 2009. Функциональные свойства натриевых каналов в клетках K562 после экстракции холестерина. Цитология. 51 (8) : 676—683.
- Bassler E. L., Ngo-Anh T. J., Geisler H. S., Ruppertsberg J. P., Grunder S. 2001. Molecular and functional characterization of acid-sensing ion channel (ASIC). J. Biol. Chem. 276 : 33 782—33 787.
- Bianchi L., Gerstbrein B., Frokjaer-Jensen C., Royal D. C., Mukherjee G., Royal M. A., Xue J., Schaefer W. R., Driscoll M. 2004. The neurotoxic MEC-4(d) DEG/ENaC sodium channel conducts calcium: implications for necrosis initiation. Nat. Neurosci. 7 : 1337—1344.
- Cantiello H. F., Stow J. L., Prat A. G., Ausiello D. A. 1991. Actin filaments regulate epithelial Na⁺ channel activity. Amer. J. Physiol. 261 : 882—888.
- Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162 : 156—159.
- Folkesson H. G. 2008. Variations in ENaC subunit composition may determine amiloride sensitivity and β -adrenergic stimulation of lung fluid absorption. Amer. J. Physiol. 294 : 399—400.
- Foller M., Kasinathan R. S., Duranton C., Wieder T., Huber S. M., Lang F. 2006. PGE2-induced apoptotic cell death in K562 human leukaemia cells. Cell. Physiol. Biochem. 17 : 201—210.
- Gamper N., Huber S. M., Badawi K., Lang F. 2000. Cell volume-sensitive sodium channels upregulated by glucocorticoids in U937 macrophages. Pflug. Arch. 441 : 281—286.
- Johnson M. D., Bao H. F., Helms M. N., Chen X. J., Tigue Z., Jain L., Dobbs L. G., Eaton D. C. 2006. Functional ion channels in pulmonary alveolar type I cells support a role for type I cells in lung ion transport. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103 : 4964—4969.
- Karpushev A. V., Ilatovskaya D. V., Pavlov T. S., Negulyaev Y. A., Staruschenko A. 2010. Intact cytoskeleton is required for small G protein dependent activation of the epithelial Na channel. PLoS ONE. 5: e8827.
- Kellenberger S. 2008. Epithelial sodium and acid-sensing ion channels. In: Sensing with ion channels. Springer Ser. Biophys. Vol. 11. XXIV. 304 p.
- Kellenberger S., Gautschi I., Schild L. 2003. Mutations in the epithelial Na⁺ channel ENaC outer pore disrupt amiloride block by increasing its dissociation rate. Mol. Pharmacol. 64 : 848—856.
- 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/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. Physiol. Rev. 82 : 735—767.
- Li T., Folkesson H. G. 2006. RNA interference for α -ENaC inhibits rat lung fluid absorption *in vivo*. Amer. J. Physiol. 290 : L649—L660.
- Ma H. P., Al-Khalili O., Ramosevac S., Saxena S., Liang Y. Y., Warnock D. G., Eaton D. C. 2004. Steroids and exogenous gamma-ENaC subunit modulate cation channels formed by alpha-ENaC in human B lymphocytes. J. Biol. Chem. 279 : 33 206—33 212.
- Mirshahi M., Mirshahi S., Golestaney N., Mishal Z., Nicolas C., Hecquet C., Agarwal M. K. 2000. Demonstration of the mineralocorticoid hormone receptor and action in human leukemic cell lines. Leukemia. 14 : 1097—1104.
- Negulyaev Y. A., Khaitlina S. Y., Hinssen H., Shumilina E. V., Vedernikova E. A. 2000. Sodium channel activity in leukemia cells is directly controlled by actin polymerization. J. Biol. Chem. 275 : 40 933—40 937.
- Negulyaev Yu. A., Vedernikova E. A. 1994. Sodium-selective channels in membranes of rat macrophages. J. Membr. Biol. 138 : 37—45.
- Negulyaev Y. A., Vedernikova E. A., Mozhayeva G. N. 1994. Several types of sodium-conducting channels in human carcinoma A-431 cells. Biochim. biophys. acta. 1194 : 171—175.
- Nilius B., Owsianik G., Voets T., Peters J.A. 2007. Transient receptor potential cation channels in disease. Physiol. Rev. 87 : 165—217.
- O'Brodovich H., Yang P., Gandhi S., Otulakowski G. 2008. Amiloride-insensitive Na⁺ and fluid absorption in the mammal distal lung. Amer. J. Physiol. 294 : 401—408.
- Prat A. G., Bertorello A. M., Ausiello D. A., Cantiello H. F. 1993. Activation of epithelial Na⁺ channels by protein kinase A requires actin filaments. Amer. J. Physiol. 265 : 224—233.
- Randrianarison N., Escoubet B., Ferreira C., Fontayne A., Fowler-Jaeger N., Clerici C., Hummler E., Rossier B. C., Planes C. 2007. (beta)-Liddle mutation of the epithelial sodium channel increases alveolar fluid clearance and reduces the severity of hydrostatic pulmonary oedema in mice. J. Physiol. 582 : 777—788.
- 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.
- Shumilina E. V., Negulyaev Y. A., Morachevskaya E. A., Hinssen H., Khaitlina S. Y. 2003. Regulation of sodium channel activity by capping of actin filaments. Mol. Biol. Cell. 14 : 1709—1716.
- Staruschenko A. V., Sudarikova A. V., Negulyaev Y. A., Morachevskaya E. A. 2006. Magnesium permeation through mechanosensitive channels: single-current measurements. Cell Res. 16 : 723—730.
- Staruschenko A. V., Vedernikova E. A. 2002. Mechanosensitive cation channels in human leukemia cells: calcium permeation and blocking effect. J. Physiol. 541 : 81—90.

Ugawa S., Yamamoto T., Ueda T., Ishida Y., Inagaki A., Nishigaki M., Shimada S. 2003. Amiloride-insensitive currents of the acid-sensing ion channel-2a (ASIC2a)/ASIC2b heteromeric sour-taste receptor channel. *J. Neurosci.* 23 : 3616—3622.

Van Renterghem C., Lazdunski M. 1991. A new non-voltage-dependent, epithelial-like Na^+ channel in vascular smooth muscle cells. *Pflüg. Arch.* 419 : 401—408.

Xiong Z.-G., Chu X.-P., Simon R. P. 2006. Ca^{2+} -permeable acid-sensing ion channels and ischemic brain injury. *J. Membr. Biol.* 209 : 59—68.

Yermolaieva O., Leonard A. S., Schnizler M. K., Abboud F. M., Welsh M. J. 2004. Extracellular acidosis increases neuronal cell calcium by activating acid-sensing ion channel 1a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101 : 6752—6757.

Поступила 29 II 2012

MOLECULAR AND FUNCTIONAL IDENTIFICATION OF SODIUM CHANNELS IN K562 CELLS

A. V. Sudarikova,^{1,*} I. O. Vassilieva,¹ E. A. Morachevskaya,¹ Yu. A. Negulyaev^{1,2}

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg,
and ² Chair of Physical and Chemical Biology of the cell, St. Petersburg State Polytechnical university;
* e-mail: anastasia.sudarikova@gmail.com

Modulations of ion channel activity underlie rapid changes in membrane transport of cations in various non-excitable cells. Previously, in smooth muscle cells, macrophages, lymphocytes, carcinoma and leukemia cell lines, non-voltage-gated sodium (NVGS) channels have been found. The activity of NVGS channels was shown to be critically dependent on the organization of actin cytoskeleton. The molecular identity of NVGS channels remains unclear. The present work is focused on molecular and functional identification of NVGS channels in human myeloid leukemia K562 cells. Degenerin/epithelial Na^+ channels (DEG/ENaC) could be considered as a possible molecular correlates. Using RT-PCR, expression of α -, β -, γ -hENaC subunits in K562 cells was detected. Various modes of the patch-clamp method were employed to examine functional properties of sodium channels, specifically, to test the effect of amiloride on single channel and integral currents. Biophysical characteristics of NVSG channels were close to ENaC; the channels have unitary conductance 12 pS (145 mM Na^+) and were impermeable for divalent cations (Ca^{2+} and Mg^{2+}). We found that amiloride did not inhibit NVGS channels. Importantly, no amiloride-blockable sodium current was detected in the plasma membrane of K562 cells. Taken together, our observations suggest that amiloride-insensitive sodium channels in K562 cells belong to the ENaC family.

Key words: plasma membrane, non-voltage-gated sodium channels, human leukemia cells, amiloride, epithelial sodium channel ENaC.