

СОПРЯЖЕННАЯ АКТИВАЦИЯ МЕХАНОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ И КАЛЬЦИЙЗАВИСИМЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ В КЛЕТКАХ 3T3 И 3T3-SV40

© В. И. Чубинский-Надеждин,^{1,*} Т. Н. Ефремова,¹
Ю. А. Негуляев,^{1,2} Е. А. Морачевская¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, и
² С.-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, 195251;
* электронный адрес: vchubinskiy@gmail.com

С использованием метода патч-кламп исследовали механозависимую регуляцию ионных каналов в культивируемых фибробластах 3T3 и 3T3-SV40. В обеих клеточных линиях наблюдали активность механочувствительных катионных каналов с проводимостью около 25 пСм в ответ на растяжение плазматической мембраны. Несмотря на очевидные различия актинового цитоскелета в нормальных и трансформированных клетках, пороговые значения стимула, необходимого для активации каналов, были близки и составляли около 55 мм рт. ст. Частота встречаемости каналов была существенно выше в трансформированных фибробластах 3T3-SV40, чем в их нетрансформированных аналогах 3T3. В обеих клеточных линиях обнаружена сопряженная активация механочувствительных кальцийпроницаемых каналов и калиевых кальцийуправляемых каналов. Анализ токов через одиночные каналы позволяет выявить функциональное взаимодействие разных каналов: стретчиндуцированный локальный вход кальция активирует калиевые каналы, которые не обладают собственной механочувствительностью. Результаты сравнительного исследования демонстрируют принципиальное сходство ионных механизмов клеточной механотрансдукции в нормальных и трансформированных фибробластах. Количественные различия касаются в первую очередь уровня функциональной активности механочувствительных каналов, обеспечивающих формирование локального кальциевого сигнала в примембранной области клетки.

Ключевые слова: клеточная мембрана, патч-кламп, механочувствительные каналы, кальциевая сигнализация, фибробласты 3T3 и 3T3-SV40.

Механозависимые реакции играют важнейшую роль в жизнедеятельности клеток и тканей млекопитающих. Изменения клеточной механики вовлечены в регуляцию передачи сигнала и сопряженного входа катионов в невозбудимых клетках. Механочувствительные (mechanically gated) катионные каналы, активирующиеся при деформации мембраны, являются ключевыми участниками клеточной механотрансдукции (Arnadottir, Chalfie, 2010). В наших предшествующих работах на клетках миелодной лейкемии человека линии K562 были изучены функциональные свойства каналов, активирующихся при локальном растяжении (stretch) мембраны. Клетки K562 оказались удобной экспериментальной моделью для исследования характеристик одиночных каналов. Была показана проводимость стретчактивируемых каналов для двухвалентных катионов — кальция и магния (Staruschenko, Vedernikova, 2002; Staruschenko et al., 2006). Проанализирована роль липидного бислоя, мембранного холестерина и актинового цитоскелета в регуляции механочувствительных кальцийпроницаемых каналов (Staruschenko et al., 2005; Morachevskaya et al., 2007; Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2011). Результаты наших последующих работ и данные литературы свидетельствуют о том, что исследуемые каналы могут обеспечивать локальный вход кальция при передаче сигнала с клеточной поверхности к цитоплазматическим структу-

рам (Gilbert et al., 2014; Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2014, 2017).

В настоящее время молекулярные основы механотрансдукции вызывают повышенный интерес в связи с изучением различных клеточных патологий, включая злокачественную трансформацию. Известно, что механические свойства раковых клеток существенно отличаются от нормальных, взятых из тех же органов и тканей (Suresh, 2007). В значительной степени это обусловлено различиями в организации актинового цитоскелета (Ровенский, Васильев, 2004). Обсуждается роль механочувствительных катионных каналов плазматической мембраны в онкотрансформации и метастазировании опухолевых клеток (Maroto, Namill, 2007; Li et al., 2015). Полагают, что повышение внутриклеточного кальция при механозависимой активации каналов является ключевым звеном, определяющим роль этих каналов в клеточной подвижности, и вносит существенный вклад в метастатическую активность и повышенную инвазивную способность раковых клеток (Maroto, Namill, 2007). В связи с этим катионные каналы, связанные с механочувствительностью, предлагают как перспективную мишень в противоопухолевой терапии. В настоящее время среди наиболее вероятных молекулярных коррелятов стретчактивируемых каналов в клетках млекопитающих рассматривают трансмембранные белки семейства TRP и Piezo1/2. Конкрет-

ные механизмы, опосредующие участие этих каналов в процессах передачи сигнала, остаются неясными.

Ранее нами была обнаружена функциональная связь стретчактивируемых каналов с кальцийзависимыми калиевыми каналами, не обладающими прямой механочувствительностью, в трансформированных фибробластах мыши (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2014; Чубинский-Надеждин, 2016). Высказываются предположения о том, что такие сигнальные комплексы ионных каналов в мембране специфичны именно для трансформированных клеток (Guéguinou et al., 2014).

Задачей настоящей работы было проведение сравнительного анализа механозависимой регуляции каналов в трансформированных клетках 3T3-SV40 и их псевдонормальных аналогах 3T3.

Материал и методика

Клеточные линии. Эмбриональные фибробласты мыши линий 3T3 («псевдонормальный фенотип») и 3T3-SV40 («трансформированный фенотип») были полу-

чены из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки культивировали на среде DMEM, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Биолот, Россия, или HyClone, США) и 80 мкг/мл гентамицина.

Растворы. В электрофизиологических экспериментах стандартный наружный раствор содержал (в мМ): 145 NaCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂ и 10 HEPES/TrisOH. При регистрации cell-attached раствор в камере был аналогичен стандартному наружному раствору с эквивалентной заменой ионов Na⁺ на K⁺. В этих условиях потенциал покоя клеточной мембраны близок к нулю. В конфигурации inside-out раствор в камере, имитирующий внутриклеточный, содержал (в мМ): 140 K-Аспартат, 5 NaCl, 2 EGTA/КОН, 1 MgCl₂, 20 HEPES/TrisOH и соответствующее количество CaCl₂ для установления концентрации свободного ионизированного кальция [Ca²⁺]_i в растворе на уровне 0.01 (pCa8) или 0.1 (pCa7) мкМ. pH всех растворов поддерживали на уровне 7.3.

Регистрация ионных токов. Электрофизиологическая установка на базе усилителя НЕКА ЕРС 8 (НЕКА, Германия), аналого-цифрового преобразовате-

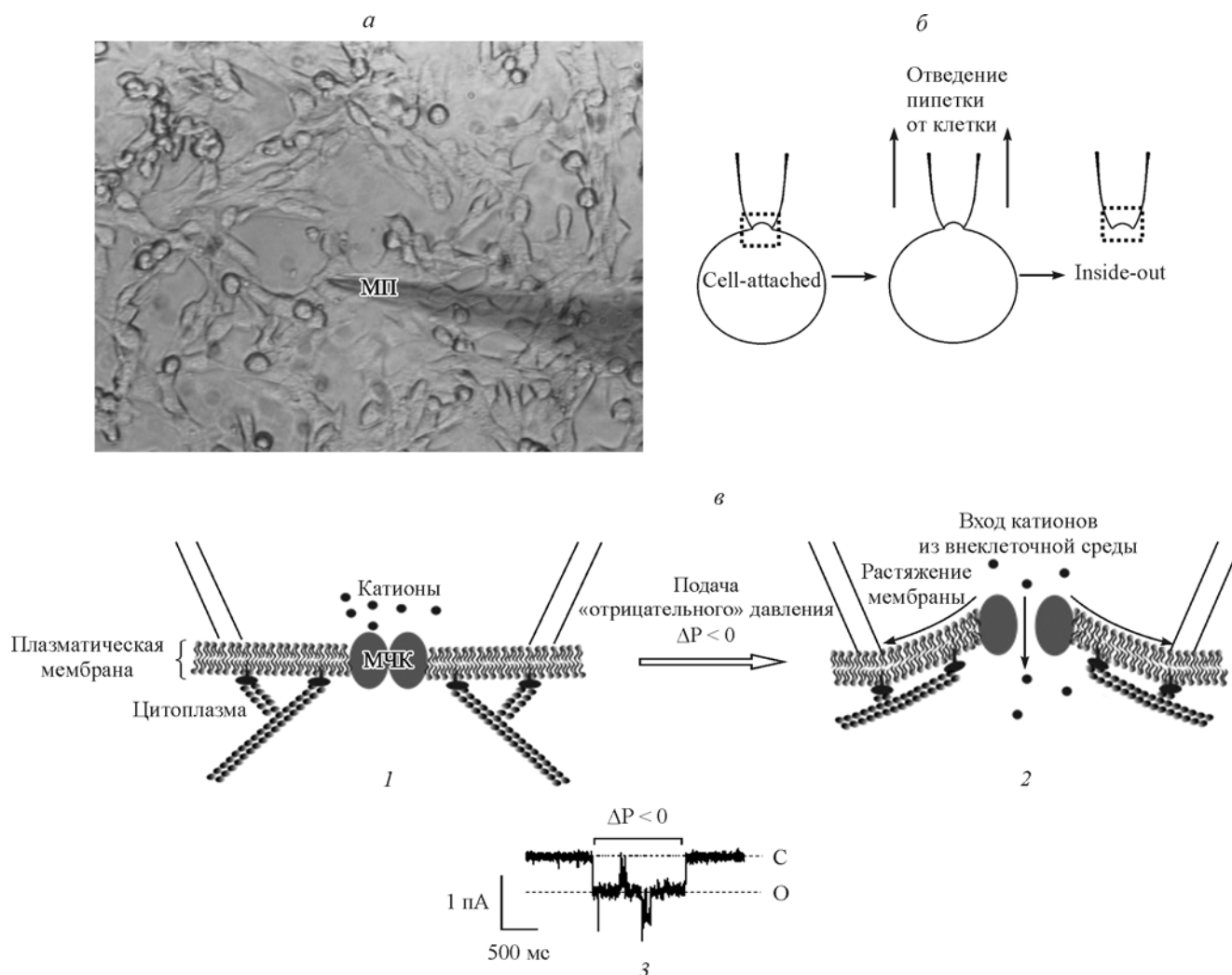


Рис. 1. Регистрация механозависимой активации ионных каналов в клеточной мембране методом патч-кламп.

a — клетки 3T3B-SV40 и регистрирующая стеклянная микропипетка (МП); фазовый контраст, об. 16×. *б* — варианты метода патч-кламп («cell-attached» и «inside-out» с фрагментом мембраны). *в* — механоактивируемые ионные токи и схема перехода механочувствительного канала (МЧК, 1) в открытое (О, 3) состояние в ответ на подачу стимула — «отрицательного» давления ($\Delta P < 0$) через регистрирующую пипетку (2). С (3) — закрытое состояние каналов, соответствующее уровню нулевого тока.

ля L-Card (Москва, Россия) и персонального компьютера укомплектована специализированным программным обеспечением для управления экспериментом и записи данных. В начале эксперимента покровные стекла с клетками помещали в камеру объемом 0.15 мл, заполненную стандартным наружным раствором (см. раздел «Материал и методика. Растворы») и помещенную на антивибрационный столик. Оптические наблюдения осуществляли с помощью инвертированного микроскопа с дифференциальным контрастом по Номарскому (об. 16×). Далее с помощью микроманипулятора стеклянную микропипетку подводили к клетке (рис. 1, а) для формирования сверхплотного контакта с плазматической мембраной. Пипетки изготавливали из боросиликатных стеклянных капилляров (BF-150-110-10) на пуллере Flaming/Brown P-97 (Sutter Instruments, США) и заполняли стандартным наружным раствором, контактирующим с внеклеточной стороной участка мембраны. С помощью метода локальной фиксации потенциала (patch-clamp) регистрировали ионные токи через одиночные каналы в участке плазматической мембраны неповрежденной клетки (вариант cell-attached) или в инвертированном мембранном фрагменте (inside-out) (рис. 1, б). В конфигурации inside-out цитоплазматическая сторона мембранного фрагмента экспонирована в раствор, имитирующий внутриклеточный, что позволяет варьировать его состав в ходе эксперимента. Все опыты проводили при комнатной температуре (22—23° С).

Механическая стимуляция и анализ данных. Использовали известный способ механической стимуляции, который состоял в растяжении участка мембраны клеток посредством уменьшения гидростатического давления в регистрирующей пипетке ($\Delta P < 0$), соединенной с манометром для регистрации уровня стимула, необходимого для активации каналов. Величину давления варьировали в пределах 20—80 мм рт. ст.; при более высоком давлении с высокой вероятностью происходило разрушение гигаомного контакта. В ответ на подачу стимула регистрировали механозависимые токи при различных потенциалах на мембране. Схема активации каналов в ответ на растяжение мембраны и пример записи механоактивируемых токов через одиночные каналы представлены на рис. 1, в. Из записей токов при различных уровнях мембранного потенциала получали характеристики одиночных каналов, идентифицировали их по проводимости и селективности. Амплитуды токов рассчитывали из амплитудных гистограмм, описанных функцией Гаусса, или оценивали с помощью программы Clampfit 10.5 из записей токов. Результаты представлены в виде средних значений и их ошибки.

Флуоресцентная микроскопия. Для выявления актиновых структур использовали стандартный способ окрашивания с помощью родамин-фаллоидина (TRITC-phalloidin, Sigma-Aldrich, Германия). Параформальдегид, Тритон X-100 и родамин-фаллоидин разводили в 1×PBS до рабочих концентраций. Клетки фиксировали 10 мин 3.7%-ным раствором параформальдегида, пермеабильзировали 8 мин 0.1%-ным Тритоном X-100 (при комнатной температуре) и инкубировали с красителем (1 мкг/мл) в течение 15 мин при 37 °С. После каждой процедуры клетки промывали 3 раза фосфатным буферным раствором PBS. Препараты монтировали на предметные стекла при помощи Vectashield (Vector Laboratories, США). Использовали конфокальный сканирующий микроскоп Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Германия)

с объективом 100×/1.4 N.A. Флуоресценцию возбуждали лазером с длиной волны 543 нм, испускание регистрировали в диапазоне волн 580—670 нм.

Результаты

Механочувствительные катионные каналы в фибробластах. В начале электрофизиологического эксперимента после формирования плотного контакта пипетки с мембраной регистрировали ионные токи в диапазоне поддерживаемых мембранных потенциалов от -70 до 40 мВ в отсутствие стимула (конфигурация cell-attached, см. рис. 1, б). В подавляющем числе опытов фоновая активность каналов была минимальной или отсутствовала. В отдельных случаях в положительной области потенциалов наблюдали токи выходящего направления, скорее всего представляющие собой спонтанную активность калиевых каналов. Согласно стандартному протоколу, механический стимул («отрицательное» давление, $\Delta < P_0$) подавали при значениях поддерживаемого потенциала на мембране $-(20-50)$ мВ. В ответ на подачу стимула, обеспечивающего растяжение участка мембраны, ограниченного отверстием пипетки, наблюдали типичную стретч-активацию каналов как в клетках 3Т3, так и в их трансформантах 3Т3-SV40 (рис. 2, а).

После отделения от клетки инвертированного мембранного фрагмента (inside-out) в растворе, не содержащем анионов хлора, амплитуда одиночных открываний каналов оставалась неизменной, что подтверждает катионную природу токов. Введение в регистрирующую пипетку гадолиния (10 мкМ GdCl_3), типичного ингибитора механочувствительных каналов, полностью блокировало активность каналов.

На основе измеренных амплитуд токов при различных потенциалах получены вольт-амперные характеристики механочувствительных каналов в клетках 3Т3 и 3Т3-SV40 (рис. 2, б). Потенциал реверсии был близок к нулю, что означает отсутствие натрий-калиевой избирательности и характерно для стретчактивируемых катионных каналов в клетках млекопитающих. Значения проводимости одиночного канала в обеих клеточных линиях были близки и составляли около 25 пСм . В клетках 3Т3 механочувствительные каналы наблюдали в 9 из 27 стабильных патчей (30 % экспериментов), в то время как в клетках 3Т3-SV40 — в 20 из 28 патчей (71 %) (рис. 2, в). Таким образом, можно полагать, что в трансформированных фибробластах уровень функциональной активности механочувствительных каналов значительно выше по сравнению с псевдонормальными аналогами.

Параметры активации и инактивации каналов. Анализ механозависимых токов показал сходство параметров активации исследуемых каналов в нормальных и трансформированных фибробластах, несмотря на известные различия системы микрофиламентов и стресс-фибрилл (рис. 2, г). В частности, оказались близкими пороговые значения стимула, необходимого для активации каналов в клетках 3Т3 (55 ± 4) и 3Т3-SV40 ($57 \pm 5 \text{ мм рт. ст.}$). Кинетические характеристики, включая значения вероятности открытого состояния каналов и выраженную задержку инактивации, в обеих клеточных линиях также существенно не различались.

Функциональное сопряжение каналов. При анализе ионных токов в трансформированных фибробластах мы обнаружили последовательную активацию

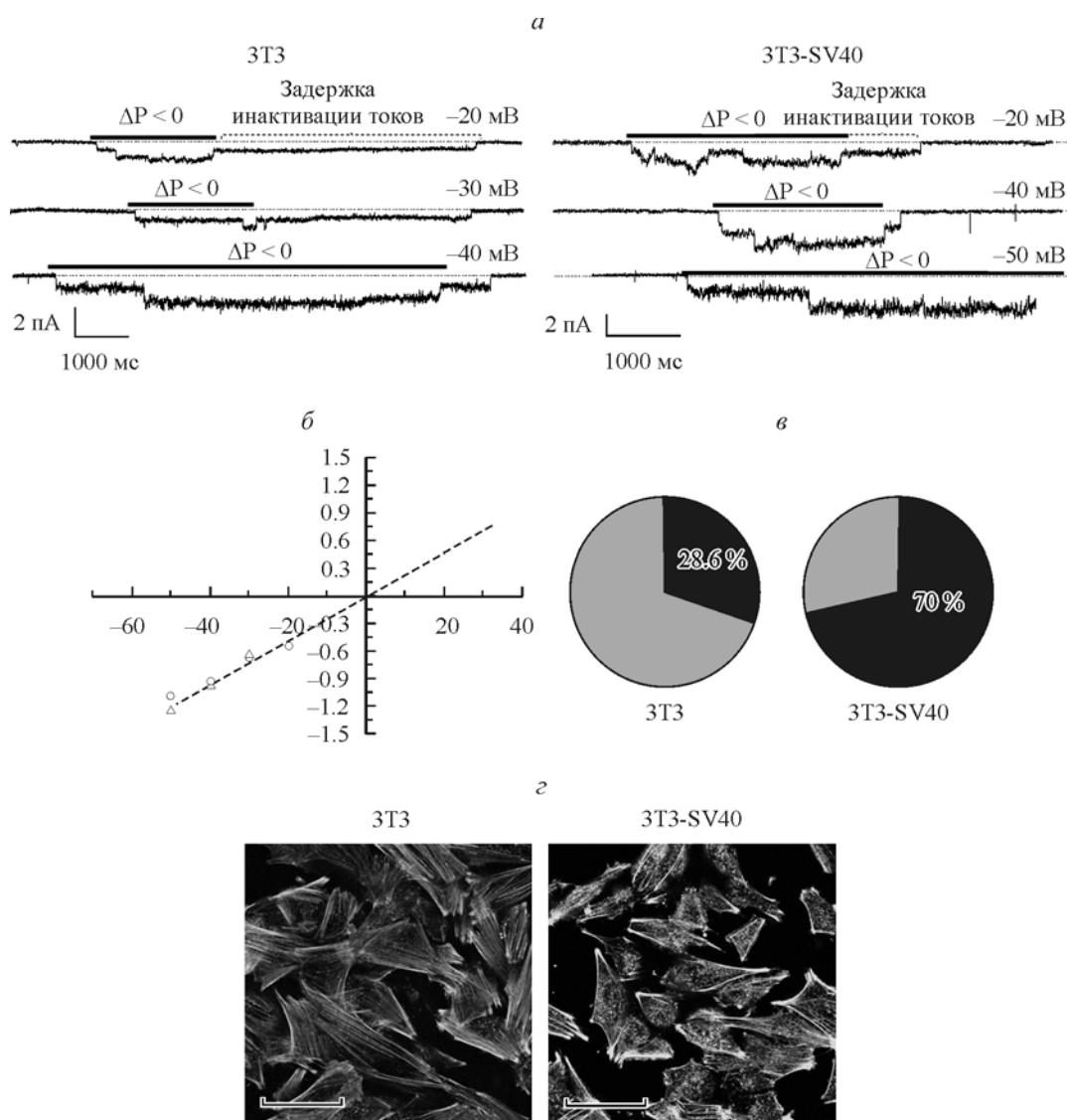


Рис. 2. Механочувствительные катионные каналы в мембране нормальных (3Т3) и трансформированных (3Т3-SV40) фибробластов.

a — регистрация «cell-attached» активности одиночных каналов в ответ на подачу стимула (ΔP , показано жирной линией) при различных уровнях поддерживаемого потенциала на мембране. *б* — вольт-амперная характеристика каналов в клетках 3Т3 (треугольники) и 3Т3-SV40 (кружки); проводимость одиночного канала 25 пСм. *в* — частота встречаемости механочувствительных каналов (указана цифрами в процентах от общего числа стабильных экспериментов). *г* — выявление актиновых элементов цитоскелета. Масштабные отрезки — 30 мкм.

различных типов каналов в процессе механотрансдукции (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2014). В связи с этим в настоящем исследовании специальное внимание было уделено феномену функционального сопряжения каналов (functional coupling). На рис. 3 показаны типичные записи механозависимых токов, представляющих собой сопряженную активацию каналов в клетках 3Т3 и 3Т3-SV40 при потенциале -20 мВ. Патч-кламп-регистрация токов пикоамперного диапазона в участке мембраны (cell-attached) позволяет различить развитие активности каналов двух различных типов. Подача механического стимула вызывала стретч-активацию токов входящего направления через механочувствительные каналы. Через 2—3 с наблюдали токи выходящего направления, отражающие активность кальцийзависимых калиевых каналов (K_{Ca} , проводимость около 10 пСм), вызванную входом кальция в цитозоль через стретчактивируемые Ca^{2+} -проводящие каналы. Важно отметить, что K_{Ca} -каналы не проявляли

собственной механочувствительности. В экспериментах на изолированных мембранных фрагментах продемонстрирована характерная зависимость активности калиевых каналов от уровня внутриклеточного кальция (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2014). В нормальных и трансформированных фибробластах мы наблюдали сходную картину сопряженной механозависимой активации кальцийпроводящих и кальцийуправляемых каналов (рис. 3). На клетках 3Т3-SV40 феномен сопряженной активации наблюдали в 10 из 20 стабильных патчей с механочувствительными каналами, в клетках 3Т3 — в 2 из 8.

Обсуждение

В нашей работе изучены механозависимые изменения ионных токов через одиночные каналы в культивируемых фибробластах 3Т3 (псевдонормальный фенотип) и

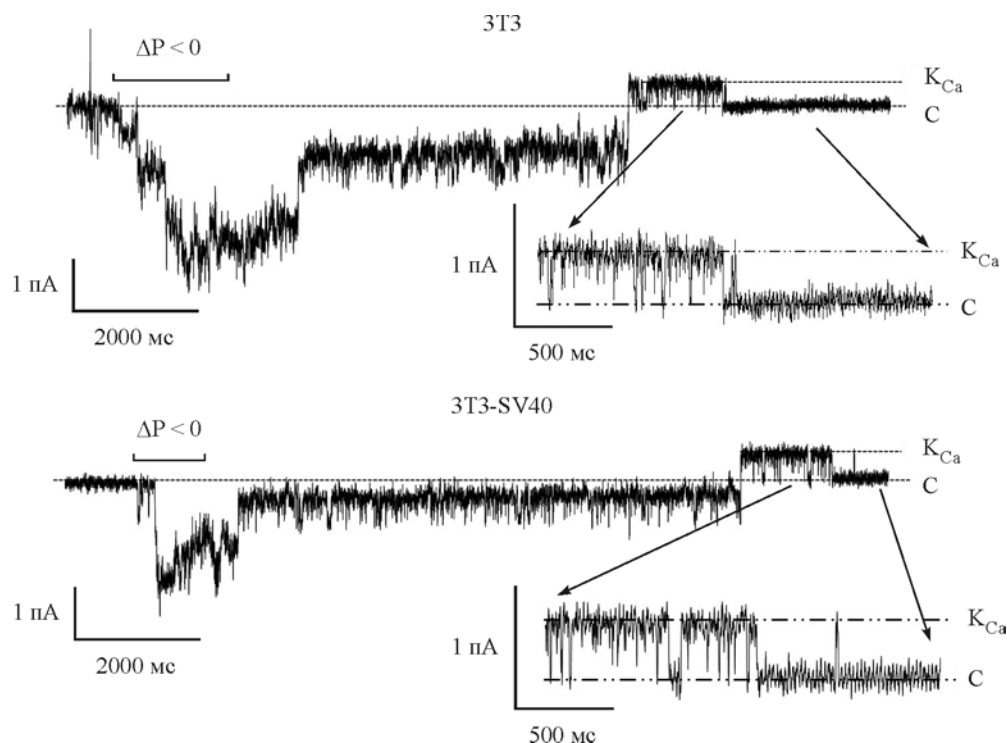


Рис. 3. Сопряженная активация механочувствительных кальцийпроводящих каналов и кальцийзависимых калиевых (K_{Ca}) каналов в клетках 3Т3 и 3Т3-SV40.

Регистрация «cell-attached» при потенциале -20 мВ. Активность K_{Ca} -каналов на участке записи (показан стрелками) представлена в расширенном масштабе. С — закрытое состояние каналов.

3Т3-SV40 (трансформированный фенотип). Активация механочувствительных ионных каналов в плазматической мембране представляет собой один из самых ранних этапов передачи сигнала при внешних воздействиях, включающих в себя изменения механического статуса нативной клетки. В нормальных и трансформированных фибробластах зарегистрирована типичная стретч-активация каналов при растяжении участка клеточной мембраны. Получены характеристики одиночных каналов в ионных условиях, близких к физиологическим: проводимость составляла около 25 пСм, что соответствует предшествующим данным на клетках 3Т3-SV40 (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2014). Ранее сообщалось о стретч-активируемых каналах, вовлеченных в подвижность фибробластоподобных клеток, проводимость которых в 55 пСм оценивали в бескальциевом растворе (Lee et al., 1999).

Нами не было обнаружено достоверных различий уровней стимула, необходимого для активации каналов в псевдонормальных и трансформированных клетках, несмотря на существенные различия в организации активного цитоскелета и степени развития стресс-фибрилл. Наши данные согласуются с тезисом о том, что именно деформация липидного билayers клеточной мембраны определяет переход механочувствительных стретч-активируемых каналов в открытое состояние (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2011). При этом клеточная механика, в частности деформируемость мембраны в нативных клетках, зависит в первую очередь от состояния примембранного цитоскелета. Как было показано ранее на клетках K562, влияние мембранного холестерина на клеточную механику и параметры активации механочувствительных каналов опосредованы перестройками актина (Chubin-

skiy-Nadezhdin et al., 2011; Чубинский-Надеждин и др., 2012). Отличительной особенностью поведения механочувствительных каналов в фибробластах по сравнению с клетками K562 (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2011) являлась задержка их инактивации после снятия стимула, которая составляла $1-2$ с и более как в нормальных, так и в трансформированных клетках (рис. 2, а). Наблюдаемая задержка инактивации механозависимых токов может быть связана с участием структур внеклеточного матрикса и (или) примембранного актинового цитоскелета.

Один из основных итогов сравнительного исследования в настоящей работе — отсутствие значимых различий биофизических характеристик механочувствительных каналов, их кинетического поведения в нормальных и трансформированных клетках. Основное различие состояло в частоте встречаемости исследуемых каналов, которая была существенно выше в трансформированных фибробластах мыши 3Т3-SV40 по сравнению с нетрансформированными 3Т3. Сопряженная механозависимая активация каналов обнаружена также в нормальных фибробластах, хотя чаще наблюдалась в трансформированных клетках. Эти количественные различия могут отражать не только разницу в функциональной активности механочувствительных и калиевых кальцийзависимых каналов, но также и различную степень их кластеризации в плазматической мембране нормальных и трансформированных клеток.

Ранее высказана гипотеза о том, что функциональное сопряжение кальцийпроводящих и кальцийуправляемых каналов присуще именно трансформированным и опухолевым клеткам (Gueguinou et al., 2014). В связи с этим специального внимания заслуживает сам факт выявления

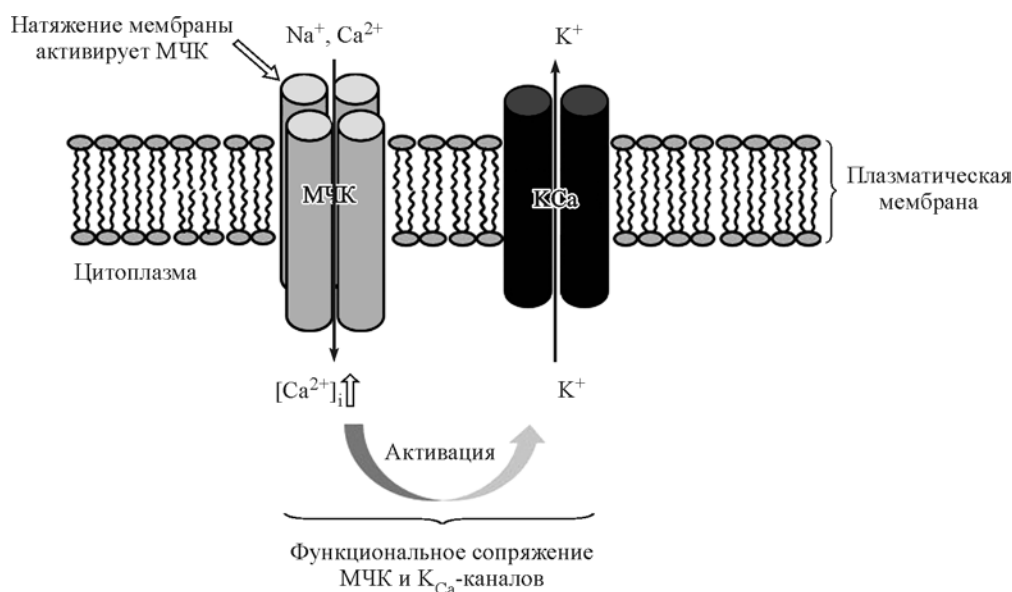


Рис. 4. Модель функционального сопряжения механочувствительных каналов (МЧК) и колокализованных с ними кальцийзависимых калиевых каналов (K_{Ca}) в плазматической мембране фибробластов.

Активация МЧК в ответ на растяжение плазматической мембраны приводит к локальному повышению уровня внутриклеточного кальция ($[Ca^{2+}]_i$) и стимуляции активности K_{Ca}.

аналогичного феномена сопряженной активации в культивируемых клетках ЗТЗ (псевдонормальный фенотип), а также в мезенхимных стволовых клетках человека (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2017).

На основании полученных нами результатов и данных литературы мы можем полагать, что молекулярным коррелятом исследуемых механочувствительных каналов являются недавно открытые мембранные белки Piezo (Coste et al., 2010). Ряд авторов сообщает о вероятной роли катионных каналов Piezo в кальциевой регуляции, клеточной подвижности, в том числе в миграции и инвазии опухолевых клеток (McHugh et al., 2012). При этом остаются открытыми вопросы о том, каким образом реализуется вклад каналов Piezo в жизнедеятельность клеток. Обнаруженная сопряженная активация ионных токов демонстрирует конкретный вариант участия механочувствительных каналов в локальной кальциевой сигнализации и передаче механического сигнала. Результаты опытов патч-кламп показывают, что стретчактивируемые каналы, не обладающие катионной селективностью, в физиологических условиях могут обеспечивать вход кальция в цитозоль, что в свою очередь может модулировать активность различных кальцийзависимых примембранных эффекторных структур, включая белки цитоскелета и молекулы адгезии (Mamoune et al., 2003; Franco, Huttenlocher, 2005).

Результаты наших исследований позволяют сделать вывод об универсальности обнаруженного механизма, опосредующего участие механочувствительных каналов в механотрансдукции и кальциевой сигнализации. Как показано на схеме (рис. 4), стретчактивируемый локальный вход кальция вызывает активацию колокализованных кальцийуправляемых каналов, не обладающих собственной механочувствительностью. В нормальных и трансформированных фибробластах мышцы обнаружено функциональное сопряжение между кальцийпроводящими механочувствительными каналами и K_{Ca}-каналами низкой проводимости (каналы SK, IK). В то же время в

мезенхимных стволовых клетках человека вход кальция через механочувствительные каналы стимулировал активность кальцийзависимых калиевых каналов высокой проводимости (BK-каналы), но не влиял на SK-каналы (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2017). В совокупности наши наблюдения свидетельствуют о присутствии функциональных кластеров кальцийпроводящих и кальцийуправляемых каналов, которые различаются по молекулярному составу в клетках различных типов. Полученные данные демонстрируют вклад исследуемых механочувствительных каналов в генерацию локальных кальциевых ответов, вероятно, обеспечивающих специфичность передачи сигналов и формирование интегральных механозависимых реакций в нативных клетках.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (В. И. Чубинский-Надеждин, проект 17-74-10123).

Список литературы

- Ровенский Ю. А., Васильев Ю. М. 2004. Морфогенетические реакции клеток и их нарушения при опухолевой трансформации. В кн.: Канцерогенез. М.: Медицина. 376—414 с. (Rovenskiy Y. A., Vasiliev Y. M. 2004. Morphogenetic reactions of cells and their disturbances in malignant transformation. In: Cancerogenesis. Moscow: Medicine. 376—414.)
- Чубинский-Надеждин В. И. 2016. Функциональное сопряжение ионных каналов — универсальный механизм клеточной механотрансдукции. Acta Naturae. Спецвыпуск. 1: 71—72. (Chubinskiy-Nadezhdin V. I. 2016. Functional coupling of ion channels as universal mechanism of cellular mechanotransduction. Acta Naturae. Special Issue. 1: 71—72.)
- Чубинский-Надеждин В. И., Няпшаев И. А., Морачевская Е. А., Анкудинов А. В. 2012. Оценка изменений жесткости клеточной мембраны после частичной экстракции мембранного холестерина. Цитология. 54 (9): 714—715. (Chubinskiy-Nadezhdin V. I., Nyapshaev I. A., Morachevskaya E. A., Ankudinov A. V. 2012. Evaluation of the changes of plasma membrane

stiffness after partial extraction of membrane cholesterol. *Tsitologiya* 54 (9) : 714—715.)

Arnadottir J., Chalfie M. 2010. Eukaryotic mechanosensitive channels. *Annu. Rev. Biophys.* 39 : 111—137.

Chubinskiy-Nadezhdin V. I., Negulyaev Y. A., Morachevskaya E. A. 2011. Cholesterol depletion-induced inhibition of stretch-activated channels is mediated via actin rearrangement. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 412 : 80—85.

Chubinskiy-Nadezhdin V. I., Negulyaev Y. A., Morachevskaya E. A. 2014. Functional coupling of ion channels in cellular mechanotransduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 451 : 421—424.

Chubinskiy-Nadezhdin V. I., Vasileva V. Y., Pugovkina N. A., Vassilieva I. O., Morachevskaya E. A., Nikolsky N. N., Negulyaev Y. A. 2017. Local calcium signalling is mediated by mechanosensitive ion channels in mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 482 : 563—568.

Coste B., Mathur J., Schmidt M., Earley T. J., Ranade S., Petrus M. J., Dubin A. E., Patapoutian A. 2010. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science*. 330 : 55—60.

Franco S. J., Huttenlocher A. 2005. Regulating cell migration: calpains make the cut. *J. Cell Sci.* 118 : 3829—3838.

Gilbert G., Ducret T., Marthan R., Savineau J. P., Quignard J. F. 2014. Stretch-induced Ca²⁺ signalling in vascular smooth muscle cells depends on Ca²⁺ store segregation. *Cardiovasc. Res.* 103 : 313—323.

Gueguinou M., Chantome A., Fromont G., Bognoux P., Vandier C., Potier-Cartereau M. 2014. K_{Ca} and Ca²⁺ channels: the complex thought. *Biochim. biophys. acta.* 1843 : 2322—2333.

Lee J., Ishihara A., Oxford G., Johnson B., Jacobson K. 1999. Regulation of cell movement is mediated by stretch-activated calcium channels. *Nature*. 400 : 382—386.

Li C., Rezaei S., Kammerer S., Sokolowski A., Devaney T., Gorischek A., Jahn S., Hackl H., Groschner K., Windpassinger C., Malle E., Bauernhofer T., Schreibmayer W. 2015. Piezo1 forms mechanosensitive ion channels in the human MCF-7 breast cancer cell line. *Sci. Rep.* 5:8364. Doi: 10.1038/srep08364.

Mamoune A., Luo J. H., Lauffenberger D. A., Wells A. 2003. Calpain-2 as a target for limiting prostate cancer invasion. *Cancer Res.* 63 : 4632—4640.

Maroto R., Hamill O. P. 2007. MscCa regulation of tumor cell migration and metastasis. In: *Mechanosensitive channels. B: Current topics in membranes*. New York: Acad. Press. 485—509.

McHugh B. J., Murdoch A., Haslett C., Sethi T. 2012. Loss of integrin-activating transmembrane protein FAM38A (Piezo1) promotes a switch to integrin-independent mode of cell migration. *PLoS ONE*. 7 : e40346.

Morachevskaya E. A., Sudarikova A. V., Negulyaev Y. A. 2007. Mechanosensitive channel activity and F-actin organization in cholesterol-depleted human leukaemia cells. *Cell Biol. Int.* 31 : 374—381.

Staruschenko A. V., Negulyaev Y. A., Morachevskaya E. A. 2005. Actin cytoskeleton disassembly affects conductive properties of stretch-activated cation channels in leukaemia cells. *Biochim. biophys. acta.* 1669 : 53—60.

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 leukaemia cells: calcium permeation and blocking effect. *J. Physiol.* 541 : 81—90.

Suresh S. 2007. Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta Biomater.* 3 : 413—438.

Поступила 6 IX 2017

COUPLED ACTIVATION OF MECHANOSENSITIVE AND CALCIUM-DEPENDENT POTASSIUM CHANNELS IN 3T3 AND 3T3-SV40 CELLS

V. I. Chubinskiy-Nadezhdin,¹ T. N. Efremova,¹ Yu. A. Negulyaev,^{1,2} E. A. Morachevskaya¹

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064, and

² Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251;

* e-mail: vchubinskiy@gmail.com

Mechano-dependent activation of ion channels in cultured fibroblasts 3T3 and 3T3-SV40 was examined using patch clamp technique. In both cell lines, we observed the activity of mechanosensitive cationic channels with unitary conductance of about 25 pS in response to plasma membrane stretch. Despite evident differences in actin network organization in normal and transformed cells, the level of stimulus needed for channel activation was similar (about 55 mm Hg). The percentage of patches with channel activity was significantly higher in transformed fibroblasts 3T3-SV40 comparing to its «normal» 3T3 counterpart. In both cell lines, we found coupled activation of mechanosensitive calcium-permeable channels and potassium calcium-activated channels. Cell-attached and inside-out single current recordings reveal functional coupling of the channels: stretch-induced local calcium entry activates potassium channels that have no intrinsic mechanosensitivity. The results of comparative study demonstrate principal similarity of ionic mechanisms of cellular mechanotransduction in normal and transformed fibroblasts. We found that transformed cells were characterized with higher level of functional activity of mechanosensitive channels that could provide local submembrane calcium signalling in the cell.

Key words: cell membrane, mechanosensitive channels, calcium signaling, patch-clamp, 3T3 and 3T3-SV40 cells.