DOI: 10.7868/S0041377118100120

НОВЫЙ МЕХАНИЗМ АКТИВАЦИИ АКТИНУПРАВЛЯЕМЫХ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ В КЛЕТКАХ К562

© А. В. Сударикова,^{1,*} В. И. Чубинский-Надеждин,¹ В. Ю. Васильева,¹ И. О. Васильева,¹ Е. А. Морачевская,¹ Ю. А. Негуляев^{1,2}

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, и ²Кафедра медицинской физики С.-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, 195251; * электронный adpec: anastasia.sudarikova@gmail.com

Работа направлена на поиск внеклеточных путей активации актинуправляемых натриевых каналов в клетках лейкемии человека К562. Натриевые каналы по своим характеристикам близки к семейству ENaC, но не обладают чувствительностью к амилориду и его производным. Для исследования действия потенциальных активаторов каналов мы использовали возможности регистрации и анализа унитарных токов при отведении токов от плазматической мембраны всей клетки (whole-cell). В режиме whole-cell показано развитие активности одиночных каналов при разборке актинового цитоскелета в ответ на подачу цитохалазина Д; биофизические свойства каналов проанализированы на уровне унитарных токов. Активацию каналов наблюдали в ответ на добавление в наружный раствор сериновой протеазы трипсина, известного стимулятора активности каналов ENaC почечного эпителия. Функциональные характеристики каналов, активированных разборкой цитоскелета или внеклеточной протеазой, совпадали. Благодаря уникальным особенностям клеточной модели, позволяющей анализировать характеристики одиночных каналов при отведении от плазматической мембраны всей клетки, был выявлен новый путь внеклеточной активации актинуправляемых каналов.

Ключевые слова: плазматическая мембрана, одиночные натриевые каналы, whole-cell, актиновый цитоскелет, протеолитическая активация

Транспорт натрия через ионные каналы из внеклеточной среды в цитоплазму электроневозбудимых клеток, в частности клеток крови, является определяющим в регуляции водно-солевого обмена, клеточного объема, пролиферации и находится под жестким комплексным контролем как внеклеточных, так и внутриклеточных процессов.

В предыдущих работах нами исследованы ионные каналы, обеспечивающие вход катионов, в клетках миелоидной лейкемии человека K562 и лимфомы U937, которые по происхождению относятся к миелоидному ряду клеток крови (см., например: Negulyaev et al., 2000; Сударикова и др., 2012; Sudarikova et al., 2015). С помощью метода патч-кламп при отведении от участка неповрежденной клеточной мембраны (cell-attached) или от мембранного фрагмента (inside-out) обнаружены натрий-селективные каналы, близкие по своим характеристикам к каналам ENaC, но не обладающие чувствительностью к амилориду и его производным. Следует отметить, что все изученные к настоящему времени пути регуляции активности амилорид-нечувствительных натриевых каналов ENaC в клетках лейкемии человека являются внутриклеточными и связаны с состоянием кортикального актинового цитоскелета (Negulyaev et al., 2000; Shumilina et al., 2000b; Sudarikova et al., 2015). Кроме того, было обнаружено, что Са²⁺, а также малые G-белки могут регулировать активность натриевых каналов в клетках K562, а внутриклеточный механизм, опосредующий их действие, включает в себя перестройки актинового цитоскелета (Maximov et al., 1997; Shumilina et al., 2003а). Полученная совокупность данных позволяет назвать натриевые каналы ENaC в клетках лейкемии K562 актинуправляемыми.

В последние годы обнаружен специфичный механизм регуляции классических эпителиальных натриевых каналов ENaC внеклеточными протеазами (Rossier, Stutts, 2009). Протеолитическое расщепление α - и γ -субъединиц канала, вызванное действием таких сериновых протеаз, как трипсин, химотрипсин и др., приводит к активации ENaC и увеличению Na⁺-тока. Практически во всех этих работах (см., например: Diakov et al., 2008; Haerteis et al., 2014) эксперименты проводили при отведении токов от плазматической мембраны всей клетки (whole-cell). Традиционно конфигурация whole-cell метода патч-кламп применяется для регистрации интегральных токов в клеточной мембране без идентификации отдельных каналов.

В настоящей работе мы использовали уникальные возможности регистрации активности одиночных каналов в клетках K562 при отведении сигнала whole-cell. Это позволяло осуществлять многократную замену внеклеточного раствора и выявить новый внеклеточный механизм регуляции актинуправляемых натриевых каналов.

Материал и методика

Клетки миелоидной лейкемии человека К562 были получены из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки культивировали на среде RPMI-1640, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Биолот, Россия) и 80 мкг/мл гентамицина, при 37 °С и 5 % CO₂. За 1—3 ч до экспериментов клетки высевали на покровные стекла (4×4 мм), предварительно покрытые L-полилизином (Sigma-Aldrich, Германия).

Электрофизиология. Регистрацию токов через ионные каналы клеточной мембраны осуществляли с помощью метода локальной фиксации потенциала патч-кламп на базе операционного усилителя AxoPatch 200В (Molecular Devices Corp., США). В конфигурации inside-out регистрировали ионные токи в изолированном фрагменте мембраны клеток K562. При отведении сигнала от целой клетки (whole-cell) измеряли токи через всю клеточную мембрану. Пипетки изготавливали из стеклянных капилляров на микрокузнице P-97 (Sutter Instrument, США). Уникальной особенностью экспериментов в режиме whole-cell на клетках крови была регистрация токов через одиночные каналы (Sudarikova et al., 2012, 2015).

Амплитуды токов, протекающих через одиночные каналы, рассчитывали из амплитудных гистограмм, описанных функцией Гаусса (расстояние между пиками соответствует амплитуде одиночного открывания канала), или оценивали с помощью программы pClamp 10.5 из записей токов (Molecular Devices Corp., CША). Для количественной оценки уровня активности каналов в мембранном фрагменте использовали значение вероятности их открытого состояния P₀ = I/Ni, где N — число работающих каналов в патче, I — средний ток для заданного временно́го интервала (рассчитывали из амплитудных гистограмм), i — средний ток через открытый канал.

В экспериментах whole-cell стандартный наружный раствор в камере содержал (в мМ): 145 NaCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂ и 10 HEPES/TrisOH; раствор в регистрирующей пипетке, имитирующий внутриклеточный, содержал (в мМ): 140 KAspartate, 5 NaCl, 2 EGTA, 1 MgCl₂ и 20 HEPES/TrisOH, pCa = 8. При отведении inside-out использовали стандартный наружный раствор в пипетке (в мМ): 145 NaCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂ и 10 HEPES/TrisOH. Раствор, контактирующий с внутриклеточной стороной мембранного фрагмента, содержал (в мМ): 140 аспартата калия (KAsp), 5 NaCl, 2 EGTA, 1 MgCl₂ и 20 HEPES/TrisOH, pCa = 8. Величина рН всех растворов составляла 7.3.

Результаты и обсуждение

В предшествующих работах нам удалось зарегистрировать активность одиночных каналов в клетках лейкемии человека в экспериментах при отведении токов от плазматической мембраны всей клетки whole-cell (Сударикова и др., 2012; Sudarikova et al., 2015), что явилось предпосылкой для проведения более детального анализа возможностей данной модели. На первом этапе работы мы сравнили эффекты активации натриевых каналов в ответ на разборку актинового цитоскелета в экспериментах на мембранных фрагментах и в конфигурации whole-cell.

Как было описано panee (Negulyaev et al., 2000; Shumilina et al., 2003а) и подтверждено в наших экспериментах inside-out, добавление во внутриклеточный раствор деструктора актиновых филаментов цитохалазина Д (ЦитД, 10 мкг/мл) приводило к активации натриевых каналов (рис. 1, a, δ). Возрастание активности происходило в среднем через 2-3 мин после подачи ЦитД. В данной конфигурации у нас есть возможность регистрировать только каналы, находящиеся непосредственно во фрагменте мембраны под пипеткой (рис. 1, а). В экспериментах whole-cell, т. е. при регистрации токов от всей мембраны клетки, также исследовали действие ЦитД. На этом же рисунке (б) представлен пример активации одиночных натриевых каналов в ответ на подачу ЦитД во внеклеточный раствор. Биофизические характеристики натриевых каналов, активирующихся при разборке актинового цитоскелета, в экспериментах на мембранных фрагментах (inside-out) и при регистрации токов от всей мембраны клеток К562 (whole-cell) совпадали, проводимость составляла около 15 пСм, потенциал реверсии 25—30 мВ (рис. 1, e). Рис. 2, a демонстрирует развитие активности натриевых каналов, активированных ЦитД, во времени (вероятность открытого состояния каналов Р. возрастала). Р., рассчитанная для временных промежутков, которые представлены на рис. 2, а под основной записью, составила 0.1, 0.12, 0.33 и 0.5 соответственно. Анализ зарегистрированных токов через одиночные каналы в разных экспериментах whole-cell показал, что в разных клетках количество функционально активных каналов значительно различалось и варьировало от 3-5 (рис. 2, a) до 50—100 (не показано). Такое разное число каналов может быть обусловлено функциональным статусом клеток, в частности нахождением их в разных фазах клеточного цикла (Rooj et al., 2012).

Известно, что характерным свойством классических эпителиальных натриевых каналов ENaC является активация в ответ на действие сериновых протеаз (Rossier, Stutts, 2009). Поскольку актинуправляемые натриевые каналы в клетках K562 близки к семейству ENaC (Сударикова и др., 2012), в следующей серии whole-cell экспериментов исследовали влияние внеклеточной протеазы трипсина на активность натриевых каналов в клетках К562. Добавление трипсина (5 мкг/мл) в раствор с наружной стороны мембраны активировало одиночные натриевые каналы (рис. 2, б). Каналы активировались через 2—3 мин после подачи трипсина. Рис. 2, б демонстрирует развитие эффекта во времени. Увеличение активности каналов в плазматической мембране было связано с ростом числа функционирующих каналов (параметр N = 12 для представленного эксперимента), в то время как индивидуальная вероятность открытого состояния Р, рассчитанная из амплитудных гистограмм, существенно не изменялась и составляла около 0.4.

Совокупность полученных данных позволяет заключить, что внеклеточная протеаза трипсин активирует актинуправляемые каналы в плазматической мембране клеток К562: биофизические характеристики каналов, активирующихся в ответ на разборку цитоскелета с помощью ЦитД или при действии трипсина, были практически идентичными. Важным отличием было увеличение вероятности открытого состояния каналов (P_o) при действии ЦитД по сравнению с увеличением числа функционально активных каналов (N), но не P_o при активации трипсином.



Рис. 1. Активация натриевых каналов в мембранном фрагменте (inside-out) и в мембране целой клетки (whole-cell), вызванная разборкой актинового цитоскелета. Записи токов до (*a*) и после (*б*) подачи ЦитД (10 мкг/мл).

а: в *углах слева* и *справа* показана схема конфигурации; поддерживаемые потенциалы на мембране указаны рядом с записями токов: з — закрытое состояние (уровень нулевого тока), о — открытое состояние канала. *в* — соответствующие вольт-амперные характеристики; проводимость каналов — 15.4 (inside-out) и 15.1 (whole-cell) пСм, потенциалы реверсии составили –25.3 и –27.1 мВ соответственно.



Рис. 2. Развитие активности одиночных каналов через 3 мин после подачи во внеклеточный раствор 10 мкг/мл ЦитД (*a*) или 5 мкг/мл трипсина (б) в клетках К562.

Записи токов в режиме whole-cell после подачи ЦитД (*a*) или трипсина (б). Активность каналов на различных временных промежутках представлена в расширенном масштабе времени под основными записями.

Таким образом, благодаря уникальным особенностям клеточной модели, позволяющей анализировать характеристики одиночных каналов при отведении от плазматической мембраны всей клетки, был обнаружен новый внеклеточный путь регуляции активности актинуправляемых каналов в клетках К562.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-04-00467) и правительства Санкт-Петербурга (для А. В. Судариковой).

Список литературы

Сударикова А. В., Васильева И. О., Морачевская Е. А., Несуляев Ю. А. 2012. Молекулярная и функциональная идентификация натриевых каналов в клетках К562. Цитология. 54 (7): 573—579. (Sudarikova A. V., Vassilieva I. O., Morachev*skaya E. A., Negulyaev Y. A. 2012.* Molecular and functional identification of sodium channels in K562 cells. Cell Tiss. Biol. (Tsitologiya). 6 (5–6): 435–441.)

Diakov A., Bera K., Mokrushina M., Krueger B., Korbmacher C. 2008. Cleavage in the gamma-subunit of the epithelial sodium channel (ENaC) plays an important role in the proteolytic activation of near-silent channels. J. Physiol. 586 : 4587—4608.

Haerteis S., Krappitz A., Krappitz M., Murphy J. E., Bertog M., Krueger B., Nacken R., Chung H., Hollenberg M. D., Knecht W., Bunnett N. W., Korbmacher C. 2014. Proteolytic activation of the human epithelial sodium channel by trypsin IV and trypsin I involves distinct cleavage sites. J. Biol. Chem. 289: 19 067—19 078.

Kleyman T. R., Carattino M. D., Hughey R. P. 2009. ENaC at the cutting edge: regulation of epithelial sodium channels by proteases. J. Biol. Chem. 284 : 20 447–20 451.

Maximov A. V., Vedernikova E. A., Hinssen H., Khaitlina S. Y. Negulyaev Y. A. 1997. Ca-dependent regulation of Na⁺-selective channels via actin cytoskeleton modification in leukemia cells. FEBS Lett. 412 : 94—96. 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.

Rooj A. K., McNicholas C. M., Bartoszewski R., Bebok Z., Benos D. J., Fuller C. M. 2012. Glioma-specific cation conductance regulates migration and cell cycle progression. J. Biol. Chem. 287 : 4053—4065.

Rossier B. C., Stutts M. J. 2009. Activation of the epithelial sodium channel (ENaC) by serine proteases. Annu. Rev. Physiol. 71 : 361–379.

Shumilina E. V., Khaitlina S. Y., Morachevskaya E. A., Negulyaev Y. A. 2003a. Non-hydrolyzable analog of GTP induces activity of Na⁺ channels via disassembly of cortical actin cytoskeleton. FEBS Lett. 547 : 27–31.

Shumilina E. V., Negulyaev Y. A., Morachevskaya E. A., Hinssen H., Khaitlina S. Y. 2003b. Regulation of sodium channel activity by capping of actin filaments. Mol. Biol. Cell. 14: 1709–1716.

Sudarikova A. V., Tsaplina O. A., Chubinskiy-Nadezhdin V. I., Morachevskaya E. A., Negulyaev Y. A. 2015. Amiloride-insensitive sodium channels are directly regulated by actin cytoskeleton dynamics in human lymphoma cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 461 : 54—58.

Поступила 16 VII 2018

NOVEL ACTIVATORY MECHANISM OF ACTIN-GATED SODIUM CHANNELS IN K562 CELLS

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

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064, and ² Department of Medical Physics, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251; * e-mail: anastasia.sudarikova@gmail.com

The work is aimed to search for extracellular regulatory pathways of actin-gated sodium channel activation in human K562 leukemia cells. The characteristics of sodium channels are close to the ENaC family except the sensitivity to amiloride and its derivatives. To study the effect of potential channel activators, we used the opportunity of recording and analyzing unitary currents in plasma membrane of K562 cells by whole-cell patch-clamp technique. The development of single channel activity induced by the disassembly of the actin cytoskeleton in response to application of cytochalasin D was shown in whole-cell experiments; biophysical properties of the channels were analyzed on unitary currents level. Activation of the channels was observed in response to the application of serine protease trypsin, a known activator of the ENaC channels in the renal epithelium, to the extracellular solution. The functional characteristics of the channels activated by the disruption of the cytoskeleton or by trypsin protease were identical. The unique feature of the cell model allowed us to analyze single channel currents in whole-cell membrane and to reveal a novel pathway of extracellular activation of actin-gated channels.

K e y words: plasma membrane, single sodium channels, whole-cell, actin cytoskeleton, proteolytic activation