

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОПРЯЖЕНИЕ ИОННЫХ КАНАЛОВ В ПРОЦЕССЕ МЕХАНОЗАВИСИМОЙ АКТИВАЦИИ В МЕМБРАНЕ КЛЕТОК K562

© 2019 г. В. И. Чубинский-Надеждин^{1, *}, Ю. А. Негуляев^{1, 2}, Е. А. Морачевская¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, 195251 Россия

*E-mail: vchubinskiy@gmail.com

Поступила в редакцию 20.04.2019 г.

После доработки 21.05.2019 г.

Принята к публикации 21.05.2019 г.

Механо-управляемые катионные каналы, активирующиеся при деформации мембраны, являются ключевыми участниками процессов передачи механических сигналов с клеточной поверхности к цитоплазматическим структурам. Оставалось неясным, каким образом реализуются механозависимые реакции с участием ионных каналов в нативных клетках. В данной работе анализировали развитие активности одиночных каналов в клетках миелоидной лейкемии человека K562 в ответ на подачу механического стимула – растяжения участка мембраны. Регистрация ионных токов с использованием классических вариантов метода патч-кламп позволила выявить функциональную кластеризацию и взаимодействие различных типов каналов в плазматической мембране в процессе механотрансдукции. В клетках K562 обнаружена сопряженная активация механочувствительных кальций-проводящих каналов и калиевых кальций-зависимых каналов. Записи токов в реальном масштабе времени демонстрируют, что поступление кальция из внеклеточной среды в цитоплазму через механо-управляемые каналы активирует колокализованные с ними калиевые каналы, которые не имеют собственной механочувствительности. В экспериментах на клетках K562 и трансформированных фибробластах 3T3-SV40 показано сохранение функционального сопряжения каналов в процессе их механозависимой активации после действия деструктора микрофиламентов цитохалазина Д. Результаты позволяют полагать, что в плазматической мембране клеток K562 и 3T3-SV40 функционируют кластеры, включающие калиевые SK-каналы и белки Piezo1/2, формирующие стретч-активируемые катионные каналы.

Ключевые слова: патч-кламп, механочувствительные каналы, клеточная мембрана, локальный вход кальция, актиновый цитоскелет, клетки миелоидной лейкемии человека K562

DOI: 10.1134/S0041377119070113

Изменения клеточной механики вовлечены в основные аспекты жизнедеятельности клеток, включая подвижность, пролиферацию, апоптоз и дифференцировку. Передача механического сигнала в клетках эукариот связана, в первую очередь, с активацией ионных каналов плазматической мембраны и реорганизацией актинового цитоскелета. В системном анализе мембранных путей механотрансдукции центральную роль отводят механо-управляемым (mechanically gated) катионным каналам, активация которых индуцируется растяжением (stretch) или деформацией мембраны (Arnadottir, Chalfie, 2010). Такие каналы принято называть также стретч-активируемыми каналами (SAC-каналами). По-видимому, именно они вовлечены в важнейшие реакции живой клетки на изменения микроокружения.

SAC-каналы вызывают повышенный интерес в связи с их предполагаемым участием в процессах клеточной адгезии и подвижности, они предлагаются в качестве перспективных мишеней противоопухолевой терапии (Maroto, Hamill, 2007). Новый импульс эти исследования получили после идентификации трансмембранных белков Piezo1/2 как молекулярных коррелятов механочувствительных катионных SAC-каналов в клетках млекопитающих и человека (Coste et al., 2010). Однако многочисленные результаты, полученные в последние годы с использованием молекулярно-генетических подходов, оставляют открытыми вопросы о том, каким образом реализуются механозависимые реакции на уровне плазматической мембраны в нативных клетках.

Новым этапом в изучении клеточной механотрансдукции стало выявление сопряженной активации различных типов катионных каналов в ответ на подачу механического стимула. Благодаря применению классических вариантов метода патч-кламп для

Принятые сокращения: K_{Ca} – калиевые кальций-зависимые каналы, SAC-каналы (stretch activated channels) – стретч-активируемые каналы.

регистрации одиночных открываний мы обнаружили функциональное сопряжение (functional coupling) каналов в процессе стретч-активации в мембране трансформированных фибробластов мышцы 3T3-SV40 (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2014) и их “псевдонормальных” аналогов 3T3 (Чубинский-Надеждин и др., 2018). В экспериментах на клетках рака простаты и на эндометриальных мезенхимных стволовых клетках человека также продемонстрировано, что вход кальция через SAC-каналы стимулирует активность колокализированных Ca^{2+} -зависимых калиевых каналов (K_{Ca}) (Maroto et al., 2012; Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2017). Надо отметить, что впервые проницаемость механочувствительных SAC-каналов для внеклеточных ионов кальция и магния была показана в экспериментах на клетках линии K562 (Staruschenko, Vedernikova, 2002; Staruschenko et al., 2006); в то же время оставалось неясным, имеет ли место перенос двухвалентных катионов при стретч-активации данных каналов в физиологических ионных условиях.

Культивируемые клетки хронической миелоидной лейкемии человека K562 – распространенный модельный объект для экспериментальных работ в самых разных областях клеточной биологии, от иммунологических оценок активности натуральных киллеров (Филатова и др., 2010) до биофизических исследований ионных каналов в электроневозбудимых клетках (см., например: Negulyaev et al., 1996; Morachevskaya et al., 2007; Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2011). По своим свойствам клетки линии K562 могут рассматриваться в качестве аналога стволовых клеток – мультипотентных предшественников клеток крови миелоидного ряда (Leary et al., 1987). Именно в клетках лейкемии человека впервые среди клеток крови были обнаружены ионные каналы, активирующиеся при растяжении участка мембраны (Negulyaev et al., 1996; Старушенко и др., 2000). В последующих работах на клетках K562 детально изучены биофизические характеристики механочувствительных SAC-каналов, включая проницаемость и проводимость для двухвалентных катионов (Staruschenko, Vedernikova, 2002; Staruschenko et al., 2006). С использованием в качестве экспериментальной модели клеток лейкемии K562 проанализирована роль липидного окружения и структур цитоскелета в регуляции SAC-каналов (Staruschenko et al., 2005; Morachevskaya et al., 2007; Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2011). В то же время отсутствуют какие-либо данные о взаимосвязи различных типов каналов в процессе стретч-активации ионных токов в культивируемых клетках K562 и в циркулирующих клетках крови. Первоначально возникли предположения, что обнаруженные механизмы локальной кальциевой сигнализации присущи именно фибробластам и фибробластоподобным распластанным клеткам с высоким отношением поверхности к объему.

Основная задача настоящей работы состояла в том, чтобы проанализировать развитие во времени ионных токов через одиночные каналы при деформации клеточной мембраны. Специальное внимание было направлено на выявление сопряженной механозависимой активации каналов в клетках лейкемии человека K562 и оценку возможного участия актинового цитоскелета.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клеточные линии и реагенты. Клетки миелоидной лейкемии человека линии K562 и эмбриональные фибробласты мышцы 3T3-SV40 были получены из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки культивировали на среде RPMI-1640 (K562) или DMEM (3T3-SV40), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Биолот, Россия или NuClone, США) и 80 мкг/мл гентамицина, при 37°C и 5% CO_2 . Клетки K562 высевали на покровные стекла (4 × 4 или 20 × 20 мм), предварительно покрытые L-полилизин (Sigma-Aldrich, США) за 1 ч до эксперимента. Эмбриональные фибробласты 3T3-SV40 высевали на покровные стекла за 2–3 сут до эксперимента (конфлюентность 70–80%). Для разрушения актинового цитоскелета к клеткам в бессывороточную среду добавляли 40 мкМ цитохалазина Д (Sigma-Aldrich, США) на 10 мин.

Электрофизиологическая установка построена на базе усилителя Axon 200B (Molecular Devices, США), аналогово-цифрового преобразователя Digidata 1550A (Molecular Devices, США) и персонального компьютера. Управление экспериментом, регистрацию и запись данных осуществляли с помощью специализированного программного обеспечения pClamp 10.5 (Molecular Devices, США). Стекла с клетками помещали в экспериментальную камеру объемом 0.15 мл, заполненную нормальным наружным раствором (см. ниже). Оптические наблюдения осуществляли с помощью инвертированного микроскопа с дифференциальным контрастом по Номарскому (объектив 16×). Далее с помощью микроманипулятора стеклянную микропипетку подводили к клетке (рис. 1а) для формирования сверхплотного гигаомного 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. Электрическое сопротивление пипеток составляло 7–10 Мом. Все эксперименты проводили при комнатной температуре (22–23°C).

Растворы. В электрофизиологических экспериментах стандартный наружный раствор в регистрирующей микропипетке содержал (в мМ): 145 NaCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES/TrisOH. В режиме отве-

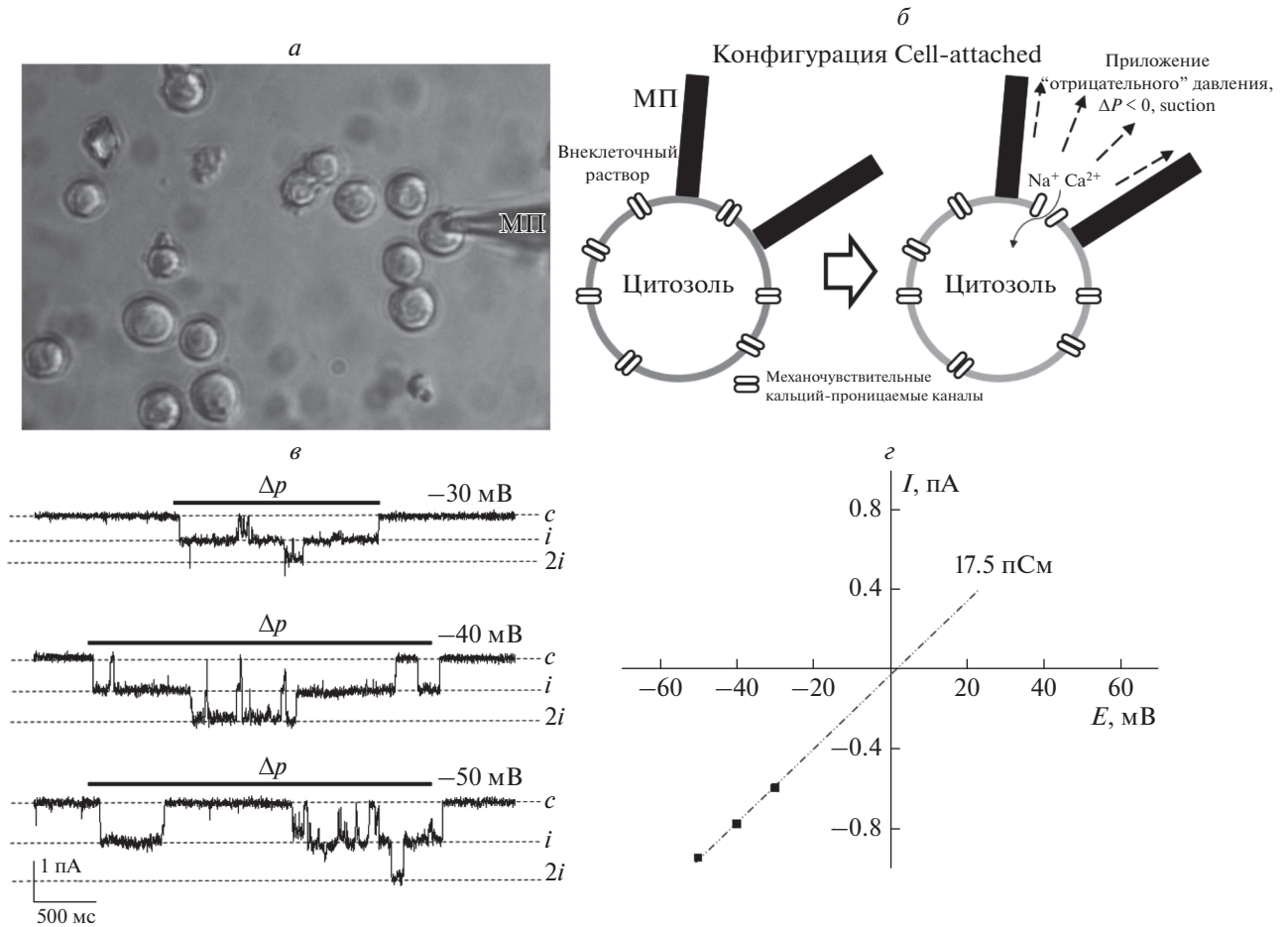


Рис. 1. Активация механочувствительных кальций-проницаемых каналов в мембране клеток миелоидной лейкемии человека линии K562. *a* – Фотография клеток K562 в экспериментальной камере с подведенной регистрирующей микропипеткой (МП); фазовый контраст, увел. об.: 16 \times . *б* – Схема подачи механического стимула путем создания отрицательного давления ($\Delta P < 0$, suction) в регистрирующей микропипетке. *в* – Типичные записи активности механочувствительных каналов при различных значениях поддерживаемого потенциала на мембране; *с* (здесь и далее) – уровень нулевого тока (закрытое состояние каналов), *i* – амплитуда тока через открытый канал. *з* – Вольт-амперная характеристика.

дения токов cell-attached раствор в камере был аналогичен стандартному наружному раствору с эквивалентной заменой ионов Na^+ на K^+ для установления потенциала покоя клеточной мембраны близким к нулю. Для всех растворов pH поддерживали на уровне 7.3.

Регистрация ионных токов и анализ данных. В начале эксперимента после образования гигаомного контакта в условиях отведения токов от участка плазматической мембраны неповрежденной клетки (вариант cell-attached, “калиевый” наружный раствор) наблюдали в течение 1–2 мин фоновую активность ионных каналов в контрольных условиях при постоянном уровне поддерживаемого трансмембранного потенциала в диапазоне от -80 до $+30$ мВ. Далее протокол был стандартным: установка потенциала (E) на заданном уровне—регистрация фоновой активности каналов при данном E —подача давления—регистрация ответа на механический стимул—снятие давления—регистрация активности после

прекращения стимуляции; далее устанавливали следующее значение E . Использовали известный способ механической стимуляции участка плазматической мембраны клеток, который состоял в натяжении (деформации) мембраны посредством снижения ($\Delta P < 0$, suction) или повышения ($\Delta P > 0$, pressure) гидростатического давления P в регистрирующей пипетке. Контроль и регистрацию уровня стимула, необходимого для активации каналов проводили при помощи манометра, соединенного с микропипеткой. В ответ на подачу стимула регистрировали механозависимые токи при различных потенциалах на мембране. Схема подачи стимула и активации каналов представлена на рис. 1б.

Обработку, фильтрацию и анализ записей токов проводили в программном обеспечении Clampfit 10.5. Из записей токов при различных уровнях мембранного потенциала получали характеристики одиночных каналов, идентифицировали их по проводимости

сти и селективности. Амплитуды токов рассчитывали из амплитудных гистограмм, описанных функцией Гаусса, или измеряли с помощью программы Clampfit 10.5. Уровень активности каналов оценивали по значению вероятности открытого состояния: $P_o = I/Ni$, где N – число элементарных уровней проводимости, I – средний ток для заданного временного интервала, i – амплитуда тока, протекающего через одиночный канал.

Флуоресцентная микроскопия. Для выявления актиновых структур использовали стандартный способ окрашивания с помощью родамин-фаллоидина (TRITC-phalloidin, Sigma-Aldrich, США). Параформальдегид, Тритон X-100 и родамин-фаллоидин разводили в однократном фосфатно-солевом буферном растворе PBS до рабочих концентраций. Клетки фиксировали 10 мин 3.7%-ным раствором параформальдегида, пермеабелизировали 0.1%-ным тритоном X-100 (8 мин при комнатной температуре) и окрашивали родамин-фаллоидином (1 мкг/мл) в течение 15 минут при 37°C. После каждой процедуры клетки промывали 2–3 раза PBS. Препараты монтировали на предметные стекла при помощи среды для флуоресцентной микроскопии Vectashield (Vector Laboratories, США). Для визуализации актиновых структур 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

Идентификация механочувствительных каналов в клеточной мембране. Ранее в литературе доминировала точка зрения, согласно которой разрушение актиновой сети индуцирует активность механочувствительных каналов плазматической мембраны; цитохалазины, известные деструкторы F-актина, являющиеся метаболитами плесневых грибов, даже рассматривались как потенциальные активаторы данных каналов (Hamill, McBride, 1996). Однако в наших работах было показано, что разборка цитоскелета приводит к активации потенциал-независимых (non-voltage-gated) натриевых каналов, которые не обладают чувствительностью к механическому стимулу (Negulyaev et al., 1996; Ведерникова и др., 1997; Negulyaev et al., 2000). Кроме того, в культивируемых клетках K562 обнаружены механо-управляемые катионные каналы (Старушенко и др., 2000; Staryuschenko, Vedernikova, 2002), типичные для клеток эукариот и принципиально отличные от актиноуправляемых натриевых каналов. На рис. 1 представлена схема регистрации механозависимых ионных токов и идентификации каналов с использованием метода патч-кламп в режиме cell-attached. В типичном эксперименте механическую стимуляцию осуществляли путем подачи отрицательного давления

($\Delta P < 0$, suction) в регистрирующей микропипетке под контролем манометра, что обеспечивает растяжение (stretch) участка мембраны, ограниченного отверстием пипетки. В ответ на подачу стимула мы наблюдали быструю активацию ионных токов, отражающую резкое увеличение вероятности открытого состояния каналов, реагирующих на деформацию мембраны, – механочувствительных каналов (рис. 1). Эффект развивался без видимой задержки и, как правило, был полностью обратим, т.е., после снятия стимула уровень активности каналов возвращался к фоновому значению, близкому к нулю.

В большинстве случаев наблюдали несколько кратных уровней тока, отражающих одновременные открывания пор нескольких независимых канальных молекул. Вероятность открытого состояния (P_o) и уровень активности каналов, оцененный как nP_o , возрастали с увеличением натяжения мембраны, в то время как амплитуда одиночных открываний и, соответственно, проводимость канала не изменялись. Таким образом, по своим воротным характеристикам обнаруженные каналы относятся к типичным стретч-активируемым (SAC-каналам).

Отсутствие адаптации к стимулу является отличительной особенностью SAC-каналов в клетках K562: активность каналов в участке мембраны сохраняется в течение всего периода стимуляции (рис. 1, 2). Как правило, разность давления ($\Delta P < 0$) при каждом значении потенциала подавали в течение 3–10 с, но и при большей продолжительности стимула существенного спада активности каналов не наблюдали. Наблюдаемые особенности поведения механочувствительных каналов в клетках лейкемии человека согласуются с описанными ранее характеристиками активации и инактивации (Старушенко и др., 2000) и дают возможность анализа ионных токов на уровне одиночных открываний каналов. В физиологических ионных условиях проводимость одиночного канала составляла 17–18 пСм (рис. 1з). В нескольких сериях патч-кламп экспериментов получены сходные данные относительно функциональной экспрессии и проводимости механочувствительных SAC-каналов в клетках K562: активность каналов наблюдали в 50–55% стабильных патчей, как в контрольных условиях, так и после модификаций липидного состава или деструкции цитоскелета (Staryuschenko et al., 2005, 2006; Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2011).

Деформация мембраны индуцирует открывания SAC-каналов. Оптимальный уровень стимула, необходимый для выявления и идентификации SAC-каналов в клетках лейкемии K562, составлял в контрольных условиях около 30–40 мм рт. ст.; средние значения P_o составляли 0.28 ± 0.03 . В большинстве экспериментов стабильность патчей сохранялась при повышении отрицательного давления до значений 60–70 мм рт. ст. ($\Delta P < 0$, suction). Это позволяло оценить характеристики SAC-каналов в различных

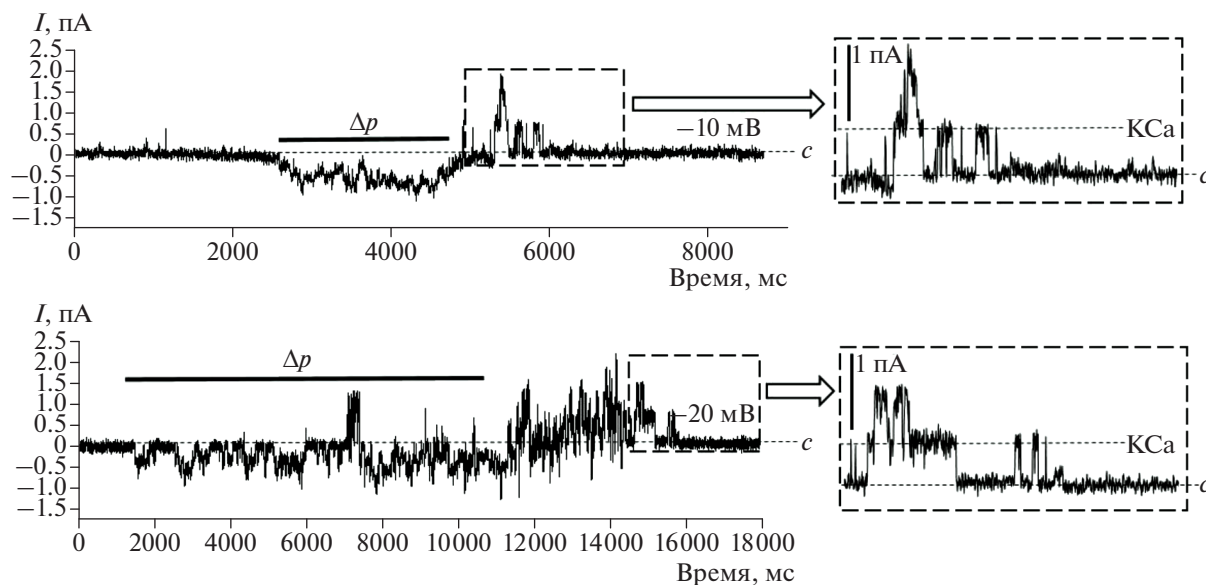


Рис. 2. Функциональное сопряжение механочувствительных кальций-проводящих каналов и кальций-зависимых калиевых (K_{Ca}) каналов в плазматической мембране клеток K562. Записи токов в режиме cell-attached регистрации при потенциалах -10 и -20 мВ. На *врезках* токи выходящего направления, отражающие активность K_{Ca} -каналов, представлены в расширенном масштабе на интервале 2 с.

условиях, в том числе при ингибировании их активности (Morachevskaya et al., 2007; Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2011). В то же время приложение через регистрирующую пипетку положительного давления ($\Delta P > 0$, pressure) с большой вероятностью приводило к необратимому росту токов утечки с последующим разрушением плотного контакта с мембраной, что вполне ожидаемо в применяемой патч-кламп технологии. Тем не менее, в нескольких экспериментах стабильность патчей сохранялась, что позволило зарегистрировать типичную активацию SAC-каналов с проводимостью 17 пСм на подачу как отрицательного ($\Delta P < 0$, 30 мм рт. ст.), так и эквивалентного положительного давления ($\Delta P > 0$, 30 мм рт. ст.). Это служит прямым аргументом в пользу моделей воротного (gating) механизма SAC-каналов, основанных на деформации липидного бислоя мембраны. В совокупности, полученные данные не только демонстрируют преимущества клеток K562 как адекватной экспериментальной модели, но также дают основания для гипотез о молекулярных прототипах исследуемых каналов.

Сопряженная механозависимая активация каналов в клетках K562. Регистрируемая фоновая электрическая активность мембраны клеток лейкемии K562 включала достаточно редко наблюдаемые токи выходящего направления через калиевые каналы, у которых отсутствовала реакция на механический стимул. Ранее отмечалось также, что выходящие токи калиевых каналов иногда затрудняли измерения амплитуды открываний исследуемых механочувствительных каналов (Старушенко и др., 2000). Проведенный нами анализ развития механозависимых токов

выявил сопряженную активацию колокализованных Ca^{2+} -транспортирующих и Ca^{2+} -управляемых каналов в мембране клеток K562 в 23 стабильных патчах. На рис. 2 показаны типичные записи ионных токов, представляющих последовательное развитие активности двух различных типов каналов в ответ на стандартный механический стимул ($\Delta P < 0$, suction, 30–40 мм рт. ст.). Механическая стимуляция вызывала стретч-активацию токов входящего направления через Ca^{2+} -проводящие SAC-каналы в клетках K562, аналогично данным на рис. 1. Далее в том же патче наблюдали развитие токов выходящего направления, отражающих опосредованную активацию каналов K_{Ca} (проводимость около 10 пСм), не имеющих собственной механочувствительности. В совокупности, имеющиеся результаты позволяют заключить, что активация K_{Ca} , наблюдаемая через 2–4 с после подачи стимула, обусловлена повышением уровня Ca^{2+} в примембранной зоне кластеризации Ca^{2+} -проводящих механочувствительных каналов.

Таким образом, в клетках K562 зарегистрирована активация K_{Ca} каналов малой проводимости (рис. 2), обусловленная стретч-индуцированным поступлением кальция в цитозоль. Полученные данные служат прямым подтверждением физиологически значимого транспорта кальция из внеклеточной среды в цитоплазму через механочувствительные SAC-каналы клеточной мембраны, не обладающие выраженной селективностью среди катионов. В наших экспериментах на культивируемых клетках K562 не было отмечено развития активности каналов K_{Ca} высокой проводимости (BK), в отличие от результатов на ме-

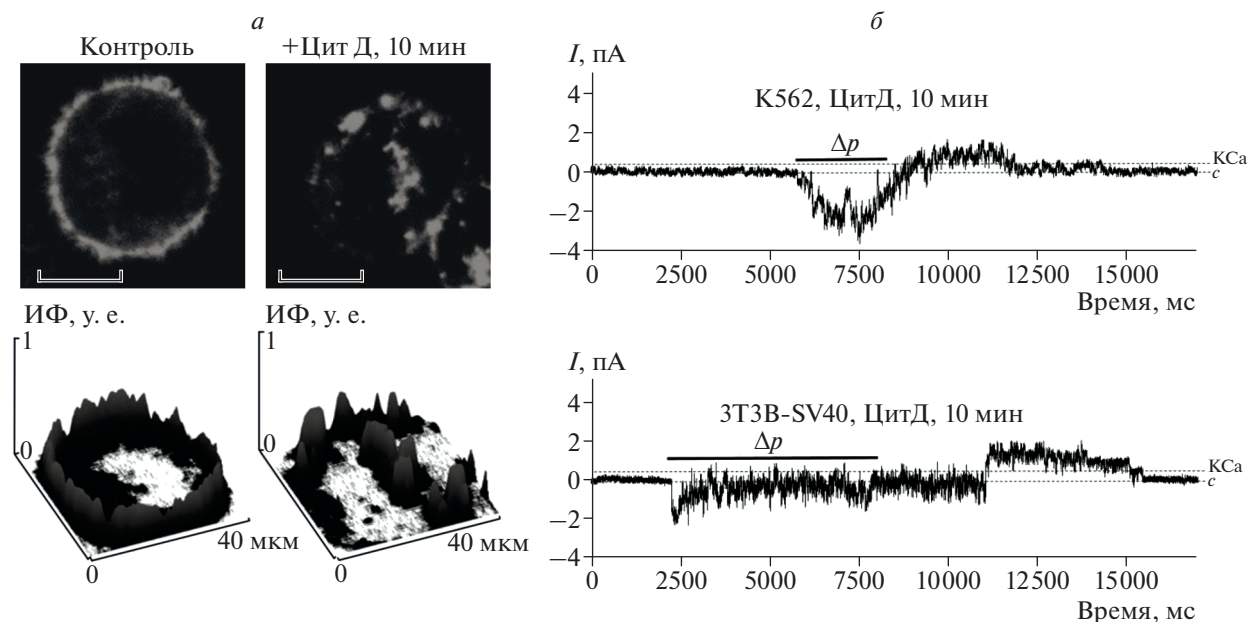


Рис. 3. Сопряженная активация каналов сохраняется после действия цитохалазина Д (Цит Д, 40 мкМ, 10 мин). *а* – Окраска F-актина в клетках K562 в контроле и после обработки Цит Д и соответствующие профили интенсивности флуоресценции (ИФ, усл. ед.). *б* – Функциональное сопряжение между механочувствительными и K_{Ca} -каналами в мембране клеток K562 и трансформированных фибробластов 3Т3-SV40 после обработки Цит Д. Поддерживаемый потенциал -20 мВ. Графическая формула Цит Д показана между записей ионных токов.

зенхимных стволовых клетках эндометриального происхождения (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2017).

эксперимента с регистрацией механозависимой активации токов.

Функциональное сопряжение каналов после действия цитохалазина Д. Сопряженная активация различных типов каналов при деформации мембраны, наблюдаемая в клетках K562, близка к зарегистрированной ранее в нормальных и трансформированных фибробластах 3Т3-SV40. Феномен функционального сопряжения описан также для других Ca^{2+} -транспортирующих каналов, не связанных с механотрансдукцией (Gueguenou et al., 2014). Среди предполагаемых механизмов, обеспечивающих колоколизацию трансмембранных белков, обсуждается возможное участие элементов актинового цитоскелета. На рис. 3а, 3б представлены результаты экспериментов на клетках K562 и 3Т3-SV40 с использованием деструктора микрофиламентов цитохалазина Д и данные по визуализации F-актина в клетках K562. После действия цитохалазина Д (40 мкМ, 10 мин) зарегистрирована типичная сопряженная активация механочувствительных SAC-каналов и K_{Ca} каналов, аналогичная наблюдаемой в контрольных клетках с интактными актиновыми структурами (рис. 2). Полученные данные позволяют полагать, что функциональное сопряжение и предполагаемая кластеризация каналов реализуется вне зависимости от целостности или разборки актинового цитоскелета. Дополнительные аргументы могли бы быть получены в экспериментах с использованием латрункулина или добавлением цитохалазина в ходе электрофизиологического

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе с использованием метода патч-кламп анализировали развитие механоактивируемых ионных токов через одиночные каналы в ответ на деформацию клеточной мембраны. Впервые показана сопряженная активация Ca^{2+} -проницаемых механочувствительных каналов и Ca^{2+} -управляемых калиевых каналов (K_{Ca}) малой проводимости (small conductance, SK) в клетках миелоидной лейкемии человека K562. Записи одиночных открываний в реальном масштабе времени показывают, что вход кальция через механо-управляемые SAC-каналы активировывает колокализованные калиевые каналы, которые не имеют собственной механочувствительности. Аналогичные данные, полученные на различных клетках млекопитающих, подтверждают функциональную кластеризацию каналов в клеточной мембране, причем механозависимые кластеры, очевидно, могут включать различные типы калиевых каналов (Maroto et al., 2012; Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2014, 2017; Чубинский-Надеждин и др., 2018).

Ионные каналы, реагирующие непосредственно на изменения механического состояния мембраны, были обнаружены нами в культивируемых клетках лейкемии K562 около 20 лет назад (Negulyaev et al., 1996; Negulyaev et al., 2000). Благодаря использова-

нию клеток K562 в качестве экспериментальной модели были детально изучены проводящие и селективные характеристики механочувствительных SAC-каналов (Staruschenko, Vedernikova, 2002; Staruschenko et al., 2006), определена роль мембранного холестерина и актинового цитоскелета в регуляции их активности (Staruschenko et al., 2005; Morachevskaya et al., 2007; Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2011). Регистрируемые в части экспериментов токи выходящего направления, представлявшие активность калиевых каналов, ранее оставались вне рассмотрения, как посторонний фактор, не связанный с клеточной механикой (Старущенко и др., 2000; Staruschenko, Vedernikova 2002; Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2011).

Активация K_{Ca} -каналов, вызванная стретч-индуцированным входом кальция из внеклеточной среды в цитоплазму, была обнаружена нами на фибробластах 3T3 и 3T3-SV40 (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2014; Чубинский-Надеждин и др., 2018), но не в клетках K562. В значительной степени это связано с особенностями кинетики механоправляемых ионных токов в фибробластах, в частности, наблюдаемой задержкой инактивации SAC-каналов после снятия стимула, составляющей 1–4 с и более. Поэтому главным итогом данной работы является выявление функционального сопряжения каналов в клетках K562, как экспериментальной модели, на которой наиболее полно изучены важнейшие индивидуальные характеристики механочувствительных SAC-каналов, типичных для плазматических мембран эукариот.

В наших исследованиях на клетках лейкемии K562, нормальных и трансформированных фибробластах (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2014; Чубинский-Надеждин и др., 2018), мезенхимных стволовых клетках (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2017) обнаружена активация различных типов K_{Ca} -каналов (SK, BK), обусловленная стретч-индуцированным входом кальция. В совокупности имеющиеся данные позволяют рассматривать функциональное сопряжение каналов как универсальный механизм, реализующийся при передаче механического сигнала в нативных клетках. Результаты, полученные на разных типах клеток, подтверждают кальциевую проницаемость механочувствительных SAC-каналов в физиологических ионных условиях. В наших экспериментах на клетках K562 и трансформированных фибробластах 3T3-SV40 показано сохранение функционального сопряжения каналов в процессе их механозависимой активации после деструкции F-актина (рис. 3). Кластеризация трансмембранных белков может также зависеть от липидного окружения, в том числе, от организации и целостности липидных микродоменов (Simons, Toomre, 2000; Guegou et al., 2014).

Полученные результаты позволяют полагать, что наиболее вероятным молекулярным коррелятом исследуемых механочувствительных SAC-каналов в клетках лейкемии K562 являются недавно открытые

мембранные белки Piezo1/2 (Coste et al., 2010). В перспективе эти предположения могут получить прямое подтверждение в патч-кламп-экспериментах на клетках K562 с использованием новых подходов для анализа одиночных открываний каналов в мембране в режиме whole-cell (Сударикова и др., 2018). Сообщается о вероятной роли катионных каналов Piezo в кальциевой регуляции и клеточной подвижности, в том числе в миграции раковых клеток (McHugh et al., 2012; Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2019). Обнаруженное сопряжение (coupling) ионных каналов свидетельствует о вероятном участии SAC-каналов Piezo в локальной кальциевой сигнализации и передаче механического сигнала в различных клетках млекопитающих, причем состав механозависимых кластеров в мембране может быть различен. Можно полагать, что в плазматической мембране клеток K562 и 3T3-SV40 функционируют кластеры, включающие калиевые SK-каналы и белки Piezo1/2, формирующие Ca^{2+} -проницаемые механочувствительные каналы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (проект 18-15-00106).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей в качестве объектов исследований не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ведерникова Е.А., Максимов А.В., Негуляев Ю.А.* 1997. Функциональные свойства и цитоскелет-зависимая регуляция натриевых каналов в плазматической мембране лейкозных клеток. Цитология. 39 (12) : 1142–1151. (*Vedernikova E. A., Maximov A. V., Neguliaev Yu. A.* 1997. Functional properties and cytoskeletal-dependent regulation of sodium channels in leukemia cell membranes. Tsitologiya. 39 (12) : 1142–1151.)
- Старущенко А.В., Мамин А.Г., Негуляев Ю.А., Ведерникова Е.А.* 2000. Активация механочувствительных ионных каналов в плазматической мембране клеток K562. Цитология. 42 (7) : 669–674. (*Staruschenko A. V., Mamin A. G., Neguliaev Yu. A., Vedernikova E. A.* 2000. Activation of mechanosensitive ion channels in plasma membrane of K562 cells. Tsitologiya. 42 (7) : 669–674.)
- Сударикова А.В., Чубинский-Надеждин В.И., Васильева В.Ю., Васильева И. О., Морачевская Е.А., Негуляев Ю.А.* 2018. Новый механизм активации актинуправляемых натриевых каналов в клетках K562. Цитология. 60 (10) : 821–825. (*Sudarikova A. V., Chubinskiy-Nadezhdin V. I., Vasileva V. Y., Vassilieva I. O., Morachevskaya E. A., Neguliaev Yu. A.* 2018. Novel activatory mechanism of actin-gated

- sodium channels in K562 cells. *Cell. Tiss. Biol. (Tsitologiya)* 60 (10) : 821–825.
- Филатова Н.А., Чубинский-Надеждин В.И., Иванов В.А., Морачевская Е.А. 2010. Чувствительность к действию естественных киллеров зависит от целостности липидных рафтов в мембране трансформированных клеток. *Цитология*. 52 (12) : 983–989. (Filatova N.A., Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Ivanov V.A., Morachevskaya E.A. 2010. Sensivity to lysis by natural killers depends on the integrity of lipid rafts in plasma membrane of transformed cells. *Tsitologiya*. 52 (12) : 983–989.)
- Чубинский-Надеждин В.И., Ефремова Т.Н., Негуляев Ю.А., Морачевская Е.А. 2018. Сопряженная активация механочувствительных и кальцийзависимых калиевых каналов в клетках 3Т3 и 3Т3-SV40. *Цитология*. 60 (1) : 14–20. (Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Efremova T.N., Negulyaev Y.A., Morachevskaya E.A. 2018. Coupled activation of mechanosensitive and calcium-dependent potassium channels in 3T3 and 3T3-SV40 cells. *Cell Tiss. Biol.* 12 (3) : 231–237.)
- Arnadóttir 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.
- Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Vasileva V.Y., Vassilieva I.O., Sudarikova A.V., Morachevskaya E.A., Negulyaev Y.A. 2019. Agonist-induced Piezo1 activation suppresses migration of transformed fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 514: 173–179.
- 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.
- Guéguinou M., Chantôme A., Fromont G., Bougnoux P., Vandier C., Potier-Cartreau M. 2014. K_{Ca} and Ca^{2+} channels: The complex thought. *Biochim. Biophys. Acta.* 1843 2322–2333.
- Hamill O.P., McBride D.W. 1996. The pharmacology of mechanogated membrane ion channels. *Pharmacol. Rev.* 48 : 231–252.
- Leary J.F., Ohlsson-Wilhelm B.M., Giuliano R., LaBella S., Farley B., Rowley P.T. 1987. Multipotent human hematopoietic cell line K562: lineage-specific constitutive and inducible antigens. *Leuk. Res.* 11 : 807–815.
- Maroto R., Hamill O.P. 2007. MscCa regulation of tumor cell migration and metastasis. In: *Mechanosensitive channels. (Part B). Current Topics in Membranes.* Amsterdam: Elsevier. 59 : 485–509.
- Maroto R., Kurosky A., Hamill O.P. 2012. Mechanosensitive Ca^{2+} permeant cation channels in human prostate tumor cells. *Channels (Austin)*. 6 : 290–307.
- McHugh B., Murdoch A., Haslett C., Sethi T. 2012. Loss of the integrin-activating transmembrane protein Fam38A (Piezo1) promotes a switch to a reduced integrin-dependent mode of cell migration. *PLoS One*. 7 : e40346.
- Morachevskaya E., Sudarikova A., Negulyaev Y. 2007. Mechanosensitive channel activity and F-actin organization in cholesterol-depleted human leukaemia cells. *Cell Biol. Int.* 31 : 374–381.
- 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 : 40933–40937.
- Negulyaev Y.A., Vedernikova E.A., Kinev A.V., Voronin A.P. 1996. Exogenous heat shock protein hsp70 activates potassium channels in U937 cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1282 : 156–162.
- Simons K., Toomre D. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1 : 31– 39.
- 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.

FUNCTIONAL COUPLING OF ION CHANNELS IN THE PROCESS OF MECHANO-DEPENDENT ACTIVATION IN K562 CELLS

V. I. Chubinskiy-Nadezhdin^{a, *}, Yu. A. Negulyaev^{a, b}, and E. A. Morachevskaya^a

^aInstitute of Cytology RAS, St. Petersburg 194064 Russia

^bPeter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251 Russia

*e-mail: vchubinskiy@gmail.com

Mechanically gated cation channels that are activated by plasma membrane deformation are the key players in the transduction of mechanical signals from cell surface to cytoplasmic structures. It remained unclear how mechanodependent reactions involving ion channels are realized in native cells. In this study, we analyzed the development of single channel activity in human myeloid leukemia K562 cell line in response to the application of mechanical stimulus by stretching the fragment of plasma membrane. Registration of ionic currents using the classical variants

of patch clamp method revealed functional clustering and the interaction of various types of the channels in the plasma membrane during mechanotransduction. Particularly, coupled activation of mechanosensitive calcium-permeable channels and potassium calcium-activated channels was found in K562 cells. Real-time current records demonstrate that calcium influx from the extracellular environment into the cytoplasm via mechanosensitive channels activates colocalized potassium channels that do not have their own mechanical sensitivity. In experiments on K562 cells and transformed 3T3-SV40 fibroblasts, functional coupling of the channels during their mechano-dependent activation was shown after incubation of cells with F-actin destructor cytochalasin D. The results allow us to assume that functional clusters of potassium SK channels and stretch-activated cation Piezo1/2 channels are presented in plasma membrane of K562 and 3T3-SV40 cells.

Keywords: patch clamp, mechanosensitive channels, cell membrane, local calcium influx, actin cytoskeleton, human myeloid leukemia K562 cells