

Ю.М. Вітко, Р.М. Лазаренко, Н.Х. Погоріла

Вплив внутрішньоклітинного введення трипсину на характеристики потенціалзалежної інактивації хлорного струму в клітинах раку простати

На эпителиальных раковых клетках линии LNCaP предстательной железы человека был исследован эффект внутриклеточно приложенного протеолитического фермента трипсина на объём активированный хлорный ток $I_{Cl,swell}$. Показано, что в клетках, перфузированных трипсином, значительно изменяются показатели развития и исчезновения тока в ответ на изменение тоничности внеклеточной среды, а также свойства его потенциалзависимой инактивации. На основании анализа полученных результатов выдвинуто предположение, что каналы, переносящие $I_{Cl,swell}$ (объёмрегулируемые анионные каналы – VRAC) обладают значительным функциональным и структурным подобием с потенциалзависимыми натриевыми, калиевыми и кальциевыми каналами, и инактивация у них происходит по принципу “ball-and-chain” инактивационной модели

ВСТУП

Незважаючи на різноманітність первинних механізмів, що спричиняють відкривання та закривання різних типів іонних каналів плазматичної мембрани, майже всі з них тією чи іншою мірою проявляють також ознаки потенціалзалежного керування. Потенціалзалежні іонні канали (натрієві, кальцієві, калієві), функціональний стан яких визначається виключно мембранним потенціалом, являють собою крайній випадок такого керування. Попередні біофізичні дослідження постулювали наявність принаймні трьох функціональних доменів, які повинні бути задіяні в потенціалзалежному керуванні: сенсор потенціалу, активаційні та інактиваційні ворота. Перші експериментальні докази щодо існування цих функціональних доменів було отримано при вивченні явища усування інактивації натрієвих каналів (процесу, спрямованого на закриття каналу при підтримуваний деполаризації) у відповідь на внутрішньоклітинне прикладання протеолітичних фер-

ментів [3]. Результати цих досліджень були інтерпретовані, як доказ наявності з цитоплазматичного боку натрієвого каналу специфічного структурного утворення, яке відповідає за його інактивацію. Відщеплення цього утворення в результаті протеолітичної обробки і призводить до втрати інактивації. Було висунуто гіпотезу, що це утворення складається з часточки (названої “ball” - м’ячик), зв’язаної з внутрішньоклітинним боком каналу ланцюжком (“chain”) і здатною закривати пору каналу через взаємодію з рецепторною ділянкою, розташованою в її внутрішньому гирлі (“ball-and-chain” модель) [2,5]. Дані по усуненню інактивації у разі внутрішньоклітинного введення трипсину були одержані також для кальцієвих каналів L-типу [10,25] і калієвих каналів [18,28,35]. Загалом ці дані свідчать, що модифікація інактивації протеолітичними ферментами може розглядатися як доказ існування специфічної внутрішньоклітинної детермінанти, яка відповідає за цей процес. Досягнення останніх років в біохімічному виділенні, молекулярному клонуванні,

© Ю.М. Вітко, Р.М. Лазаренко, Н.Х. Погоріла

визначенні первинної структури і структурно-функціональному аналізу основних каналотворювальних субодниць натрієвих, кальцієвих і калієвих каналів дали змогу безпосередній фізичній ідентифікації структурних елементів, які відповідають за ту чи іншу функцію, включаючи ті, які впливають на потенціалзалежну інактивацію. Більше того, було доведено, що молекулярні групи, звернені в цитозоль і, схоже, задіяні в потенціалзалежній інактивації натрієвих і калієвих каналів, дійсно функціонують згідно з “ball-and-chain” або “hinged-lid” (“кришка на петлі”) механізмами [4,6,11].

Хлорні струми, що активуються у відповідь на набухання клітини ($I_{Cl,swell}$), хоча і радикально відрізняються від струмів транспортних потенціалкеруваними іонними каналами стосовно механізму активації, проте виявляють помітну потенціалзалежну інактивацію при мембранних потенціалах, вищих за +50 мВ [13,15,16,23]. Цей струм притаманний багатьом типам клітин, де він задіяний у регуляторному зменшенні клітинного об'єму (RVD – Regulatory Volume Decrease) – процесу, що дозволяє відновлення об'єму клітини за умов гіпоосмотичного стресу [21, 23,30].

Молекулярна природа об'ємрегульованого аніонного каналу (VRAC – Volume Regulated Anion Channel), який переносить $I_{Cl,swell}$, досі не відома, що унеможливорює ідентифікацію структурних частин, які відповідають за його специфічні властивості, включаючи інактивацію. Вважається, що інактивація $I_{Cl,swell}$ за своєю природою є потенціалзалежною, однак дотепер не існує ніяких доказів наявності в складі VRAC спеціалізованих інактиваційних доменів. Це не виключає можливості того, що інактивація VRAC не є його внутрішньою властивістю, а може зумовлюватись якимось додатковими ендогенними регуляторними факторами. Хоча інактивація $I_{Cl,swell}$ відбувається за досить високих мембранних потенціалів, що не дозволяє припустити її суттєву роль в фізіологічних функціях цього струму, подальші дослідження механізмів інактивації та факторів,

що на неї впливають, дозволять скласти повніше уявлення про молекулярну організацію VRAC.

Нещодавно ми вперше описали VRAC-опосередкований $I_{Cl,swell}$ в лінії епітеліальних клітин карциноми простати людини, LNCaP (Lymph Node Carcinoma of the Prostate), і нами було показано чутливість цього струму до регуляції через тирозинове фосфорилування [26]. У цій роботі ми зосередили увагу на дослідженні впливу внутрішньоклітинно введеного трипсину на властивості $I_{Cl,swell}$ у клітинах LNCaP. Отримані нами результати свідчать про існування у VRAC структурного внутрішньоклітинного інактиваційного домену, ферментативне розщеплення якого не лише усуває інактивацію $I_{Cl,swell}$, але і змінює характеристики активації струму у відповідь на набухання клітини.

МЕТОДИКА

Клітини лінії LNCaP (American Type Culture Collection) культивували в середовищі RPMI 1640 з додаванням 5 ммоль/л L-глутаміну, 10%-ї ембріональної бичачої сироватки (“Gibco BRL, США”), 50000 од./л пеніциліну та 50 мг/мл стрептоміцину. Клітини вирощували в флаконах місткістю 50 мл при 37°C в інкубаторі зі зволоженою атмосферою 95% O₂ та 5% CO₂. Для електрофізіологічних експериментів клітини висаджували в чашки Петрі, покриті поліорнітином, і використовували протягом 4 - 6 діб.

Мембранні струми в LNCaP клітинах реєстрували з використанням методики patch-clamp у конфігурації “ціла клітина”. Відомо, що в LNCaP-клітинах наявний потенціалзалежний ТЕА-чутливий калієвий струм [27]. Для того, щоб відокремити досліджуваний об'ємактивованій хлорний струм від калієвого, ми використовували ТЕА як основний катіон для зовнішньоклітинних розчинів. Осмотичність ізо- та гіпотонічних розчинів становила 310 і 190 мосмоль/л відповідно. Склад зовнішньоклітинних розчинів був таким:

Склад розчину	Norm	Нуро-Norm	Iso-TEA	Нуро-TEA
NaCl	145	70	-	-
KCl	5	5	-	-
CaCl ₂	2	2	2	2
MgCl ₂	2	2	2	2
Глюкоза	5	5	10	10
HEPES	10	10	10	10
TEA-Cl	-	-	145	80

Реєструвальну піпетку заповнювали внутрішньоклітинним розчином наступного складу (ммоль/л): КОН – 100, КСІ – 40, MgCl₂ – 1, HEPES – 10, EGTA – 10, Mg-АТФ – 5; рН 7,2 (доводили глютаміною кислотою). Опір реєструвальних піпеток коливався в межах 3-5 МОм. Трипсин (1 мг/мл, тип-II, “Sigma”, США) та соєвий інгібітор трипсину (10 мг/мл, тип-II-S) додавали безпосередньо у внутрішньоклітинний розчин, без істотних змін осмотичності. Заміни зовнішніх розчинів проводили за допомогою багатоствольної мікропіпетки зі спільним виотком, який розташовували в безпосередній

близькості до досліджуваної клітини. Повна зміна зовнішнього розчину відбувалася за час не більший ніж 1с. Усі реактиви, які використовували для приготування розчинів були від фірми “Sigma”, США.

РЕЗУЛЬТАТИ

У разі заміни нормального зовнішньоклітинного розчину на розчин зі зниженою на 40% тоничністю в клітинах LNCaP розвивався струм з ознаками зовнішнього випрямлення та потенціалом реверсії –20 мВ, що за значенням був досить близьким до розрахункового рівноважного потенціалу для іонів Cl⁻ (рис. 1,а). Цей струм ($I_{Cl,swell}$) починав розвиватися після затримки (латентний період) 93,3 мс±38,4 мс і набував максимальної густини в 63 пА/пФ ± 7 пА/пФ при +120 мВ протягом наступних 298 с ± 55 с (рис. 2,а,б), в той час, коли повернення в ізотонічний розчин призводило до досить швидкого та фактично повного зменшення $I_{Cl,swell}$ протягом 103 с ± 28 с. У відповідь

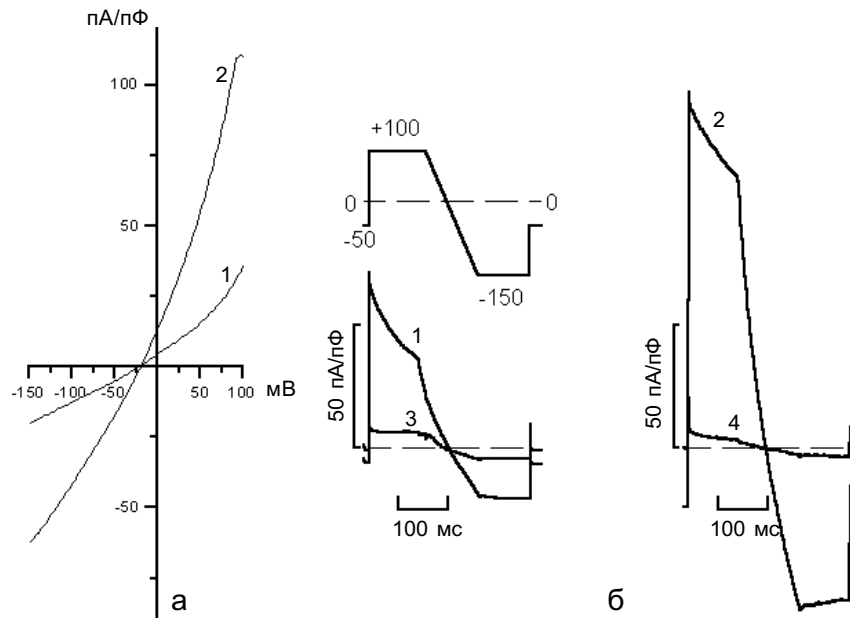


Рис. 1. Потенціалзалежність хлорного струму, викликаного гіпотонічністю в клітинах LNCaP: а – вольт-амперні характеристики струмів викликаних гіпотонічністю, одержані за записами 1 та 2 в контролі (1) і за наявності трипсину (2); б – записи струмів одержані в ізотонічному розчині IsoTEA (3, 4) та після розвитку ефекту гіпотонічності в контролі (1) і після дії трипсину (2).

на ступінчасту деполяризацію до потенціалів вищих за +60 мВ спостерігалася залежна від часу інактивація цього струму, рівень якої збільшувався з підвищенням деполяризації. При потенціалі +120 мВ зменшення струму внаслідок інактивації можна було описати як суму спадаючої експоненти та її постійного компонента зі сталою часу експоненти (τ_{in}) $67 \text{ мс} \pm 5 \text{ мс}$ і амплітудою (A_{exp}), яка більше, ніж в 5 разів перевищує амплітуду постійного струму (A_{sus}) (рис. 3,в). Оскільки $I_{Cl,swell}$ не має жодних ознак потенціалзалежної активації, а його інактивація досить повільна, на вольт-амперній характеристиці максимального струму не видно впливу жодного з цих процесів. З іншого боку, вольт-амперна характеристика постійного компоненту залежала не лише від рушійної сили для іонів хлору, але і від постійного рівня інактивації. Таким чином, поділивши сталі значення

вольт-амперної характеристики на максимальні, можна отримати криву залежності стаціонарної інактивації, усереднені значення якої наведені на рис. 3,г. Апроксимація рівнянням Больцмана, що використовується для опису розподілу заряджених воротних частинок між двома енергетичними рівнями в електричному полі, дозволяє визначити такі показники стаціонарної інактивації контрольного струму, як потенціал половинної інактивації $V_{1/2} = +59,76 \text{ мВ} \pm 2,9 \text{ мВ}$, фактор нахилу (що визначає ефективний заряд воротних частинок) $k = -26,13 \text{ мВ} \pm 1,8 \text{ мВ}$ і мінімальний рівень інактивації $I_{\infty} = 0,20 \pm 0,03$.

Включення в patch-піпетку 1 мг/мл трипсину не викликало помітних змін базової лінії струму (див.рис. 1,6,в) за умов ізотонічності протягом 10 хв діалізу. Зважаючи на те, що трипсин є досить великою молекулою з молекулярною масою 20 кДа перед

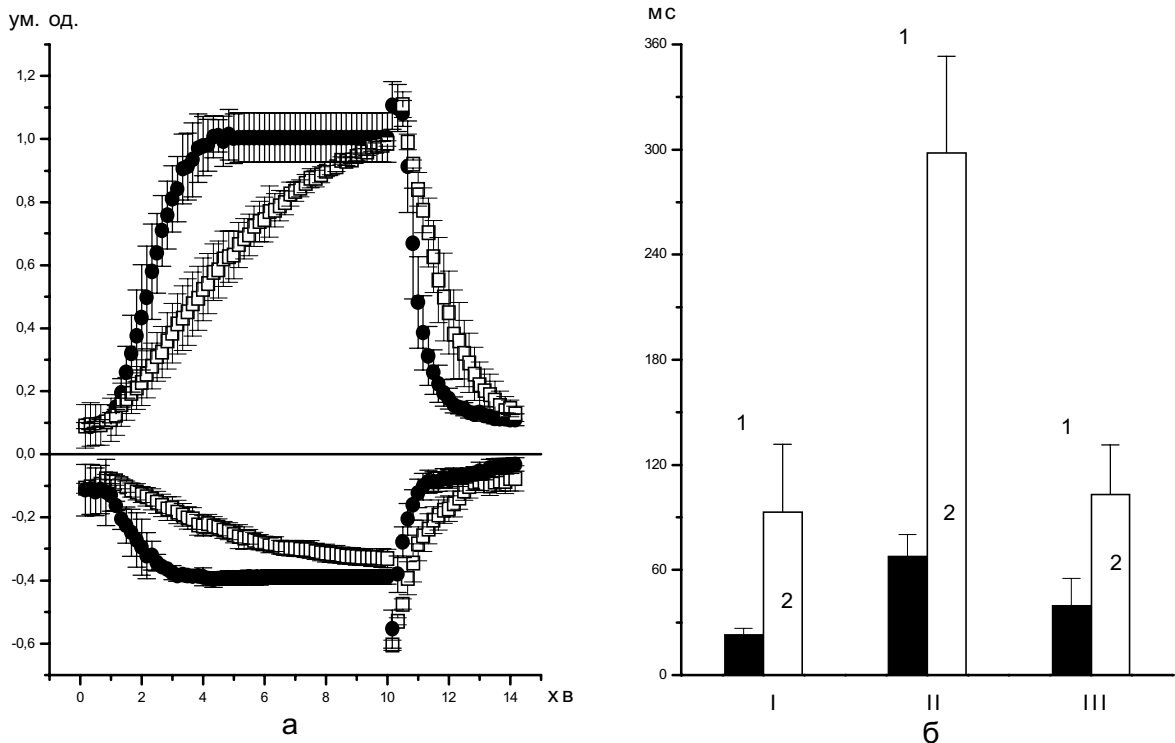
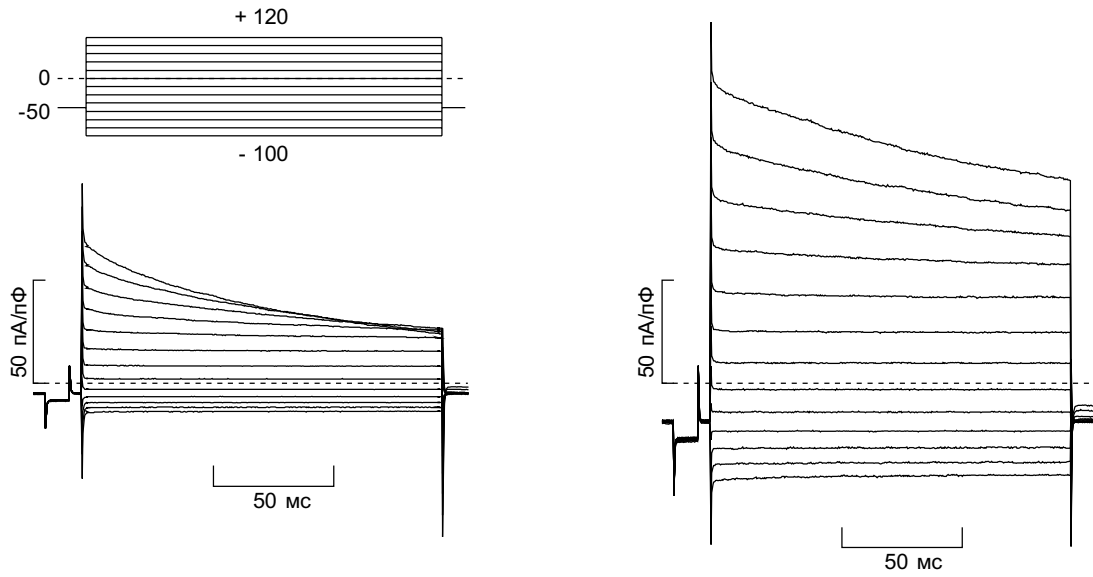
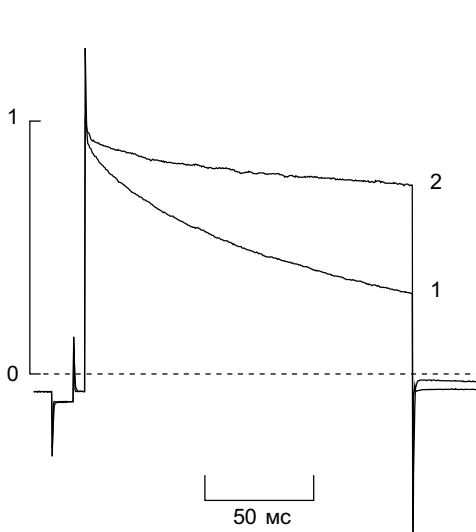


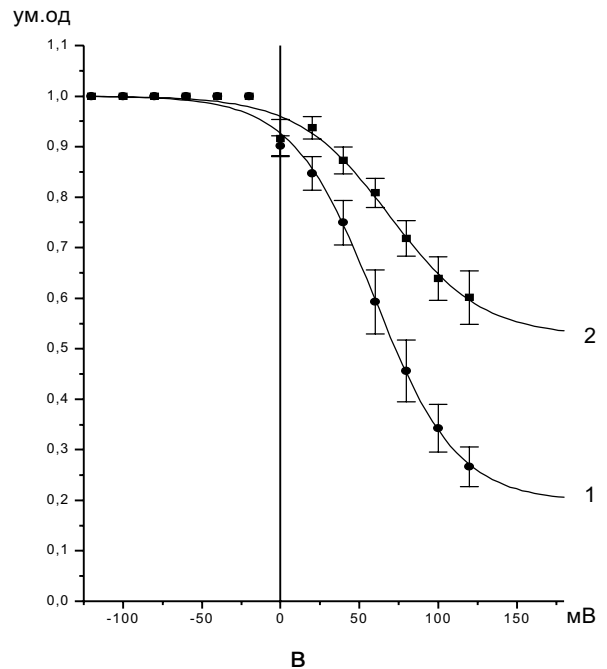
Рис. 2. Вплив внутрішньоклітинного трипсину на активаційні характеристики $I_{Cl,swell}$: а - часова залежність розвитку струмів у відповідь на зміну зовнішньоклітинної тонічності в контролі (світлі символи) і за наявності трипсину (темні символи); б - латентний період (I), час розвитку (II) і час зменшення (III) струму в контролі (1) і в клітинах предіалізованих трипсином (2).



а



б



в

Рис. 3. Модифікація потенціалзалежної інактивації хлорного струму, викликаного гіпотонічністю, в клітинах LNCaP: а – записи повністю розвинуеного струму, одержані в контролі (зліва) та за наявності трипсину (справа) у відповідь на вказану зверху схему стимуляції клітини прямокутними імпульсами потенціалу від рівня підтримуючого потенціалу -50 мВ; б – пронормовані струми при потенціалі $+120$ мВ у контролі (1) та в клітинах з трипсином (2); в – усереднені значення стаціонарної інактивації в контролі (кружечки) і для трипсинмодифікованих клітин (квадратики); суцільні лінії найкращим чином апроксимують експериментальні точки за рівнянням Больцмана.

прикладанням гіпотонічного розчину ми зазвичай чекали щонайменше 8 хв, щоб концентрація трипсину в клітині наблизилася до його концентрації в піпетці. За дослідженнями Push і Neher [24] стала часу експоненційного росту концентрації внутрішньопіпеточного розчину в клітині залежить від молекулярної маси m (Да), опору доступу піпетки (R_a) та об'єму клітини (V), згідно з таким емпіричним рівнянням: $\tau = 0,6 \cdot R_a \cdot m^{1/3} \cdot V \cdot 1897^{-1}$. Середні значення для об'єму LNCaP клітин $V = 4000$ мкм³, опору доступу піпетки $R_a = 6 \cdot 10^{-6}$ Ом (опір звичайно вищий за опір піпетки без клітини). Відтак, рівень τ для трипсину становить близько 3,5 хв. Таким чином, 8 хв діалізу достатньо для того, щоб концентрації трипсину в піпетці та в клітині зрівнялися.

За наявності внутрішньоклітинного трипсину в клітинах LNCaP у відповідь на прикладання гіпотонічного розчину активувався струм, потенціал реверсії якого був подібним до контрольного $I_{Cl,swell}$, але зі значно зміненими показниками розвитку, інактивації та максимальної амплітуди. На рис. 2,а наведено порівняння усереднених пронормованих часових залежностей розвитку хлорних струмів, активованих у відповідь на зміну зовнішньоклітинної тонічності, в контрольній клітині та в клітині предіалізованій трипсином. Наявність трипсину, перш за все, призводила до значного прискорення реакцій $I_{Cl,swell}$ на зміни зовнішньоклітинної осмотичності. Всі три часові показники, які характеризують поведінку струму у відповідь на прикладання гіпотонічності та відновлення ізотонічності - латентний період, час розвитку струму та час його зменшення скорочувалися більш ніж утричі, порівнянно з контролем (T_{lat} від $93,33 \pm 38,4$ до $23,33 \pm 3,3$ с, T_{dev} від $298,33 \pm 55,04$ до $68 \pm 12,4$ с, T_{dim} від $103,33 \pm 28,48$ до $40 \pm 15,27$ с; див. рис. 1,д).

Внутрішньоклітинне введення трипсину спричинювало також значне зниження інактивації $I_{Cl,swell}$ при високих позитивних потенціалах (рис. 3) та до більш ніж двохразового збільшення його максимальної густини

(від $62,6 \pm 6,9$ при $+120$ мВ у контролі до $138,25$ пА/пФ $\pm 10,3$ пА/пФ при аплікації трипсину). На рис. 3,в порівнюються пронормовані записи струмів $I_{Cl,swell}$ при $+120$ мВ, отримані від контрольних і трипсидіалізованих клітин. Аналіз фази експоненційного спаду цих струмів свідчить про те, що таке сповільнення інактивації під дією внутрішньоклітинного трипсину відбувається завдяки значному збільшенню сталої часу компоненти експоненційного спаду (від 67 ± 5 до 170 мс ± 29 мс), зменшенню її амплітуди та одночасному збільшенню амплітуди постійної компоненти настільки, що внесок обох компонент в загальний $I_{Cl,swell}$ ставав приблизно однаковим (див. рис. 3,в).

Апроксимація рівнянням Больцмана кривої стаціонарної інактивації модифікованого трипсином $I_{Cl,swell}$ (див.рис. 3,г), отриманої із співвідношення його постійної та максимальної вольт-амперних характеристик, показала, що така модифікація також призводить до позитивного зсуву потенціалу половинної інактивації майже на 10 мВ (до $V_{1/2} = +69,3$ мВ $\pm 7,3$ мВ), зменшення потенціалчутливості на 12% ($k = -29,2$ мВ $\pm 3,8$ мВ) і до збільшення мінімального рівня інактивації майже втричі порівняно з контролем ($I_{\infty} = 0,53 \pm 0,4$).

Додавання до внутрішньоклітинного розчину разом з 1 мг/мл трипсину 10 мг/мл інгібітора трипсину усувало протеолітичні модифікації $I_{Cl,swell}$ таким чином, що всі його характеристики не відрізнялися від контрольних. Пригнічення ефектів трипсину інгібітором трипсину вказує на те, що ці ефекти дійсно пов'язані з протеолітичною активністю ферменту.

ОБГОВОРЕННЯ

Отриманні результати свідчать про те, що внутрішньоклітинна активність трипсину призводить до: 1) прискорення реакцій $I_{Cl,swell}$ на зміни зовнішньоклітинної осмотичності; 2) усунуванню його інактивації та 3) збільшенню амплітуди. Протеолітична модифікація стру-

мів була раніше описана для потенціалзалежних натрієвих [3,8], калієвих [18,28,35] і кальцієвих каналів [10,25]. Основною рисою такої модифікації було значне уповільнення інактивації струмів, яке часто супроводжувалося потенціацією амплітуди [8]. Така поведінка цілком узгоджується з моделлю Ходжкіна і Хакслі, в якій передбачається, що усунення інактивації повинно призводити до збільшення струму. Однак прогресивне зменшення натрієвого струму в гігантському аксоні кальмара під час викликаного протеазою уповільнення інактивації [10], так само як і розділення в часі індукованих трипсином процесів підвищення амплітуди та уповільнення інактивації кальцієвого струму в кардіоміоцитах [3], говорить про те, що інактиваційні ворота є не єдиною структурою, яка зазнає впливу з боку внутрішньоклітинних протеаз і, що, напевно, існують деякі інші важливі детермінанти, котрі теж зазнають цього впливу.

Експерименти зі структурно-функціонального аналізу принципових α_1 -субодиниць натрієвих, калієвих і кальцієвих каналів, експресованих у штучних системах, дозволили ідентифікувати структурні домени цих каналів, задіяні в інактивації. Було виявлено, що головну роль в їх інактивації натрієвих каналів відіграє внутрішньоклітинна петля між гомологічними доменами III і IV їх α_1 -субодиниці. Вона закриває пору із внутрішньоклітинного боку завдяки взаємодії її кластера із трьох амінокислотних залишків, що утворюють інактиваційну частку, з рецепторною ділянкою внутрішнього гирла каналу [32]. Механізм інактивації натрієвих каналів більш адекватно описується "hinged lid", ніж "ball-and-chain" моделлю тому, що згадана петля є досить короткою, розміщуючи інактиваційну частку дуже близько до внутрішнього гирла каналу [6].

Різні типи кальцієвих каналів демонструють значні відмінності в рівні потенціалзалежної інактивації, яка, однак, завжди значно повільніша за інактивацію натрієвих каналів. Крім того, деякі типи кальцієвих ка-

налів мають специфічний механізм кальційзалежної інактивації. Хоча первинні α_1 -субодиниці натрієвих і кальцієвих каналів мають подібну структуру, немає жодних доказів того, що ділянка між доменами III і IV, чи будь яка інша цитоплазматична петля або терміналь задіяна в потенціалзалежній інактивації кальцієвих каналів. Досить несподівано потенціалзалежна інактивація кальцієвих каналів була пов'язана з трансмембранним сегментом S6 гомологічного домену I та безпосередньо прилягаючих до нього зовнішньої та внутрішньоклітинних ділянок [36]. На противагу, структурні ділянки α_1 -субодиниці кальцієвого каналу, задіяні в кальційзалежній інактивації, містяться серед деяких цитоплазматичних структур, а саме I-II і II-III петлі та C-терміналь [1].

Схоже, що тільки потенціалзалежна інактивація калієвих каналів відповідає класичному "ball-and-chain" механізму. Використовуючи Shaker B-калієвий канал як модель для вивчення потенціалзалежної інактивації, було показано, що перші 20 залишків його N-терміналі формують інактиваційну частку ("ball"), що з'єднана з каналом за допомогою ланцюжка ("chain"), утвореного наступними 63 залишками [11].

Таким чином, якщо молекулярні субстрасти для протеолітичної модифікації потенціалзалежної інактивації натрієвих і калієвих каналів можуть бути легко ідентифіковані, для кальцієвих каналів така ідентифікація є далеко не очевидною. Той факт, що інактиваційний домен кальцієвого каналу важко досяжний з цитоплазматичного боку, а збільшення амплітуди кальцієвого струму під дією трипсину значно випереджає в часі уповільнення інактивації [10] говорить про те, що головними мішенями для протеолітичної модифікації кальцієвих каналів можуть бути внутрішньоклітинно обернені групи, задіяні в кальційзалежній інактивації, регуляції та/або провідності.

Визначення молекулярних детермінант, які відповідають за протеолітичну модифікацію $I_{Cl,swell}$, описану в нашому дослідженні,

є ще більш умовним. Таке визначення ускладнюється тим фактом, що молекулярна природа каналів, що лежать в основі об'єм активованих провідностей, зовсім невідома. Експериментальна перевірка трьох клонованих білків із досить різною структурою, котрі розглядалися як можливі кандидати на роль об'ємактивованого каналу - ClC-2, P-glycoprotein та pCln, дала негативні результати [20,23,29]. Істотні сумніви виникають також щодо члена ClC родини потенціалзалежних хлорних каналів ClC-3, який ще донедавна був досить перспективним кандидатом [7]. Останні дані свідчать про те, що ClC-3 навряд чи бере участь як у генерації $I_{Cl,swell}$, так і у RVD [17,34], що спонукає пошуки нових потенційних кандидатів на роль VRAC.

Стосовно хлортранспортуючих каналів взагалі, то трипсиніндукована модифікація була продемонстрована для ендогенних CFTR [33]. Ця модифікація полягала в перманентній активації CFTR каналу в ізольованих мембранних фрагментах у відповідь на прикладання трипсину з внутрішньоклітинного боку, що було пояснене відщепленням трипсином ділянки, яка задіяна в інактивації. Мутаційні дослідження каналу ClC-2, якому притаманна властивість об'ємзалежності, через що він розглядався як потенційний каналоутворювальний VRAC-білок, показали, що його функціонування непогано узгоджується з механізмом "ball-and-chain". При цьому N-терміналь імовірно відіграє роль інактиваційної часточки, а цитоплазматична петля між трансмембранними доменами D7 і D8 утворює рецепторну ділянку [9,14]. Знищення N-терміналі або мутації D7-D8 петлі унеможлилювали керування каналу як об'ємом, так і потенціалом, що призводило до його постійного знаходження у відкритому стані.

Показана нами комплексна дія внутрішньоклітинного трипсину на $I_{Cl,swell}$ свідчить про те, що детермінанти VRAC, які відповідають за об'ємзалежність, потенціалзалежну інактивацію та провідність, розташовані з внутрішнього боку мембрани та є

легко доступними для протеолітичного розщеплення. Проте ми не можемо визначити, яка з цих характеристик $I_{Cl,swell}$ першою зазнає модифікації, як це було зроблено для кальцієвих струмів у кардіоміоцитах [10], адже активація $I_{Cl,swell}$ під впливом гіпотонічності відбувається за термін, який порівняний з часом, необхідним для збільшення концентрації трипсину в клітині. Таке визначення допомогло б судити про відносну доступність окремих детермінант із внутрішньоклітинного боку та зробити обґрунтовані висновки стосовно їх локалізації.

Загалом, майже повне усунення потенціалзалежної інактивації $I_{Cl,swell}$ трипсином свідчить про те, що подібно до натрієвих і калієвих каналів, об'ємактивований канал може функціонувати відповідно до "ball-and-chain" або "hinged-lid" механізмів та мати у своїй структурі відповідні детермінанти. При цьому, зважаючи на можливу схожість структури VRAC і членів ClC родини хлорних каналів можна висунути припущення, що N-терміналь VRAC відіграє роль "ball-and-chain" воріт з рецепторною ділянкою для "ball", розташованою на одній з внутрішньоклітинних петель, які з'єднують трансмембранні домени, як це передбачалося для ClC-2 каналу [14]. Схоже, що збільшення густини $I_{Cl,swell}$ у відповідь на дію трипсину, є вторинним до усунення інактиваційних воріт, що призводить до збільшення ймовірності перебування каналів у відкритому стані.

Нині досить умовними є судження про природу детермінант, відщеплення яких трипсином спричинює збільшення чутливості $I_{Cl,swell}$ до змін клітинного об'єму, адже механізми об'ємочутливості VRAC досі невідомі. Наприклад, для ClC-2-каналу одні і ті ж структурні детермінанти, а саме N-терміналь та D7-D8-петля, є істотними для активації каналу як об'ємом, так і потенціалом [9,14]. Можна припустити, що це справедливо і для VRAC, і що чутливість $I_{Cl,swell}$ до змін об'єму клітини є наслідком відщеплення всього інактиваційного домену, який за нормальних умов може виконувати аутоінгібуючу функцію.

Таким чином, наші результати свідчать, що об'ємактивовані аніонні канали, котрі переносять $I_{Cl,swell}$, мають великий ступінь функціональної і, найвірогідніше, структурної гомології з потенціалзалежними натрієвими, калієвими та хлорними каналами.

**Y.M. Vitko, R.N. Lazarenko,
N.C. Pogorelaya**

INTRACELLULAR TRYPSIN EFFECTS ON THE VOLTAGE-DEPENDANT INACTIVATION OF VOLUME-SENSITIVE CHLORIDE CURRENT IN PROSTATE CELLS

By means of the patch-clamp technique we have studied the effects of intracellular applied trypsin, a known modulator of membrane channel function, on the properties of the Cl⁻ current induced by hypotonicity-obliged cell swelling ($I_{Cl,swell}$) in human prostate cancer epithelial cells, LNCaP. Intracellular infusion of 1 mg/ml of trypsin into LNCaP cells via the patch pipette shortened the delay for the onset and the time of development of $I_{Cl,swell}$ in response to hypotonicity as well as accelerated the rate of current diminution following the return to isotonic conditions. The maximal density of $I_{Cl,swell}$ in the presence of intracellular trypsin was 2-fold higher while the current voltage-dependent inactivation at high depolarizing potentials was virtually eliminated. Intracellular co-application of the trypsin inhibitor together with trypsin abolished all effects of trypsin. We conclude that VRACs share a great degree of functional and structural homology to voltage-gated Na⁺, K⁺ and Cl⁻ channels by having intracellular inactivation domain subjected to proteolytic cleavage that function in conformity with "ball-and-chain" inactivation model.

A.A. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

Робота підтримана грантом INTAS-99-01248.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Adams B., Tanabe T. Structural regions of the cardiac Ca channel $\alpha 1C$ subunit involved in Ca-dependent inactivation // *J. Gen. Physiol.* - 1997. - **110**. - P. 379-389.
- Armstrong C.M. Sodium channels and gating currents // *Physiol. Rev.* - 1981. - **61**. - P. 644-683.
- Armstrong C.M., Bezanilla F., Rojas E. Destruction of sodium conductance inactivation in squid axons perfused with pronase // *J. Physiol.* - 1973. - **62**. - P. 375-391.
- Armstrong C.M., Hille B. Voltage-gated ion channels and electrical excitability // *Neuron.* - 1998. - **20**. - P. 371-380.
- Bezanilla F., Armstrong C.M. Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments // *J. Physiol.* - 1977. - **70**. - P. 549-566.
- Catterall W.A. Molecular properties of sodium and calcium channels // *J. Bioenerget. and Bio-membr.* - 1996. - **28**. - P. 219-230.
- Duan D., Winter C., Cowley S. et al. Molecular identification of a volume-regulated chloride channel // *Nature.* - 1997. - **390**. - P. 417-421.
- Gonoi T., Hille B. Gating of Na channels. Inactivation modifiers discriminate among models // *J. Gen. Physiol.* - 1987. - **89**. - P. 253-274.
- Gränder S., Thiemann A., Pusch M., Jentsch T.J. Regions involved in the opening of ClC-2 chloride channel by voltage and cell volume // *Nature.* - 1992. - **360**. - P. 759-762.
- Hescheler J., Trautwein W. Modification of L-type calcium current by intracellularly applied trypsin in guinea-pig ventricular myocytes // *J. Physiol.* - 1988. - **404**. - P. 259-274.
- Hoshi T., Zagotta W.N., Aldrich R.W. Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation // *Science.* - 1990. - **250**. - P. 506-507.
- Jackson P.S., Morrison R., Strange K. The volume-sensitive organic osmolyte-anion channel VSOAC is regulated by nonhydrolytic ATP binding // *Amer. J. Physiol.* - 1994. - **267**. - C1203-1209.
- Jackson P.S., Strange K. Characterization of the voltage-dependent properties of a volume-sensitive anion conductance // *J. Gen. Physiol.* - 1995. - **105**. - P. 661-676.
- Jordt S.E., Jentsch T.J. Molecular dissection of gating in the ClC-2 chloride channel // *EMBO J.* - 1997. - **16**. - P. 1582-1592.
- Kubo M., Okada Y. Volume regulatory Cl⁻ channel currents in cultured human epithelial cells // *J. Physiol.* - 1992. - **456**. - P. 351-371.
- Levitan I., Garber S.S. Voltage-dependent inactivation of volume-regulated Cl⁻ current in human T84 colonic and B-cell myeloma cell lines // *Pflüg. Arch.* - 1995. - **431**. - P. 297-299.
- Li X., Shimada K., Showalter L.A., Weinman S.A. Biophysical properties of ClC-3 differentiate it from swelling-activated chloride channels in Chinese hamster ovary-K1 cells // *J. Biol. Chem.* - 2000. - **275**. - P. 35994-35998.
- Mayorga-Wark O., Costantin J., Dubinsky W.P., Schultz S.G. Effects of a Shaker K⁺ channel peptide and trypsin on K⁺ channel in *Necturus* enterocytes // *Amer. J. Physiol.* - **265**. - C541-C547.

19. Meyer K., Korbmacher C. Cell swelling activates ATP-dependent voltage-gated chloride channels in M-1 mouse cortical collecting duct cells // J. Gen. Physiol. - **108**. - P. 177-193.
20. Nilius B., Eggermont J., Voets T., Droogmans G. Volume-activated Cl⁻ channels // Gen. Pharmacol. - 1996. - **27**. - P. 1131-1140.
21. Nilius B., Eggermont J., Voets T. et al. Properties of volume-regulated anion channels in mammalian cells // Progr. Biophys. and Molec. Biol. - 1997. - **68**. - P. 69-119.
22. Oiki S., Kubo M., Okada Y. Mg²⁺ and ATP-dependence of volume-sensitive Cl⁻ channels in human epithelial cells // Jap. J. Physiol. - 1994. - **44**. - S77-S79.
23. Okada Y. Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl⁻ channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor // Amer. J. Physiol. - 2000. - **279**. - P. C755-C789.
24. Push M., Neher E. Rates of diffusional exchange between small cells and a measuring patch pipette // Pflüg. Arch. - 1988. - **411**. - P. 201-211.
25. Shuba Y.M., Hesslinger B., Trautwein W. et al. Dual-pipette technique that permits rapid internal dialysis and membrane potential measurement in voltage-clamped cardiomyocytes // Pflüg. Arch. - 1990. - **415**. - P. 767-773.
26. Shuba Y.M., Prevarskaya N., Lemonnier L. et al. Volume-regulated chloride conductance in the LNCaP human prostate cancer cell line // Amer. J. Physiol. - 2000. - **279**. - P. C1144-C1154.
27. Skryma R.N., Prevarskaya N.B., Dufy-Barbe L. et al. Potassium conductance in the androgen-sensitive prostate cancer cell line, LNCaP: involvement in cell proliferation // Prostate. - 1997. - **32**. - P. 112-122.
28. Solaro C.R., Lingle C.J. Trypsin-sensitive, rapid inactivation of a calcium-activated potassium channel // Science. - 1997. - **277**. - P. 1694-1698.
29. Strange K. Identity of the outwardly rectifying, swelling-activated anion channel: Time to reevaluate pICln // J. Gen. Physiol. - 1998. - **111**. - P. 617-622.
30. Strange K., Emma F., Jackson P.S. Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels // Amer. J. Physiol. - 1996. - **270**. - P. C711-730.
31. Stühmer W., Conti F., Suzuki H. et al. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel // Nature. - 1989. - **339**. - P. 597-603.
32. Vassilev P.M., Scheuer T., Catterall W.A. Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation // Science. - 1988. - **241**. - P. 1658-1661.
33. Welsh M.J., Li M., McCann J.D. Activation of normal and cystic fibrosis Cl⁻ channels by voltage, temperature, and trypsin // J. Clin. Invest. - 1989. - **84**. - P. 2002-2007.
34. Weylandt K.H., Valverde M.A., Nobles M. et al. Human ClC-3 is not the swelling-activated chloride channel involved in cell volume regulation // J. Biol. Chem. - 2001. - **276**. - P. 17461-17467.
35. Zagotta W.N., Hoshi T., Aldrich R.W. Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB // Science. - 1990. - **250**. - P. 568-571.
36. Zhang J.F., Ellinor P., Aldrich R.W., Tsien R.W. Molecular determinants of voltage-dependent inactivation in calcium channels // Nature. - 1994. - **372**. - P. 97-100.

*Ін-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН
України, Київ*

*Матеріал надійшов до
редакції 8.02.2002*