

ВЛИЯНИЕ ЛАТРУНКУЛИНА В, ДЖАСПЛАКИНОЛИДА И БРЕФЕЛЬДИНА А НА ДЕПОЗАВИСИМЫЙ ВХОД Ca^{2+} В МАКРОФАГИ

© Л. С. Курилова, З. И. Крутецкая, О. Е. Лебедев

Кафедра биофизики С.-Петербургского государственного университета;
электронный адрес: cozzy@mail.ru

С использованием флуоресцентного Ca^{2+} -зонда Fura-2AM исследовано влияние модификаторов актинового цитоскелета и ингибитора везикулярного транспорта на депозависимый вход Ca^{2+} , вызванный пуринергическими агонистами (АТФ или УТФ) и ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз (тапсигаргином и циклопязониковой кислотой) в перитонеальных макрофагах крысы. Показано, что влияние на депозависимый вход Ca^{2+} деполимеризатора микрофиламентов латрункулина В зависит от времени предварительной инкубации клеток с данным агентом. При коротком времени инкубации наблюдается первоначальное усиление входа Ca^{2+} в клетку. При более длительном времени преинкубации вход Ca^{2+} практически полностью подавлен. Стабилизатор кортикальных микрофиламентов джасплакинолид предотвращает активацию депозависимого входа Ca^{2+} , но не влияет на вход Ca^{2+} после опустошения депо. Ингибитор везикулярного транспорта брефельдин А, инактивирующий малые G-белки семейства arf, оказывает аналогичное действие. Результаты исследований подтверждают модель депозависимого входа Ca^{2+} «связывание по типу секреции», предполагающую обратимую транслокацию внутриклеточного Ca^{2+} -депо к плазматической мембране, происходящую с участием микрофиламентов и белков arf.

Ключевые слова: депозависимый вход Ca^{2+} , перитонеальные макрофаги, микрофиламенты, ингибитор везикулярного транспорта брефельдин А.

Принятые сокращения: ЦПК — циклопязониковая кислота, ЭР — эндоплазматический ретикулум, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ — внутриклеточная концентрация Ca^{2+} .

Практически все агонисты, связываясь с мембранными рецепторами, вызывают двухфазное увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в клетках. В качестве первой фазы выступает кратковременная мобилизация Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Вторая фаза, более длительная, связана с входом Ca^{2+} из наружной среды. В возбудимых клетках вход Ca^{2+} осуществляется по потенциалзависимым Ca^{2+} -каналам. В то же время пути входа Ca^{2+} в невозбудимые клетки изучены значительно меньше. В настоящее время предполагают, что одним из основных механизмов входа Ca^{2+} в электрически невозбудимые клетки является так называемый депозависимый, или «емкостной», вход Ca^{2+} . В соответствии с моделью «емкостного» входа Ca^{2+} (Putney, 1990; Berridge, 1995; Parekh, Putney, 2005) вход Ca^{2+} регулируется степенью заполнения Ca^{2+} -депо таким образом, что опустошение депо активирует вход Ca^{2+} . В то же время механизм, посредством которого мобилизация Ca^{2+} из депо регулирует вход Ca^{2+} , а также молекулярная природа депозависимых Ca^{2+} -каналов остаются неясными.

Выделяют несколько групп моделей депозависимого входа Ca^{2+} : модели с участием водорастворимых вторичных посредников, модель «конформационного связывания» («conformational coupling» model), модели, предполагающие встраивание в плазматическую мембрану мембранных везикул, содержащих депозависимые Ca^{2+} -каналы (Putney et al., 2001; Parekh, 2003). Тем не менее истинный механизм депозависимого входа Ca^{2+} мо-

жет, по-видимому, включать в себя элементы всех разновидностей моделей, как это постулируется в недавно предложенной модели связывания по типу секреции (secretion-like coupling model) (Patterson et al., 1999; Rosado, Sage, 2000), предполагающей обратимую транслокацию эндоплазматического ретикула (ЭР) к плазматической мембране, и последующие белок-белковые взаимодействия между IP_3 -рецептором и депозависимым Ca^{2+} -каналом, приводящие к активации емкостного входа. Все группы моделей, кроме модели с участием водорастворимого вторичного мессенджера, предполагают участие элементов цитоскелета в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} . Кроме того, модель встраивания в мембрану везикул, содержащих депозависимые Ca^{2+} -каналы, и модель «связывания по типу секреции» предполагают также и участие механизма везикулярного транспорта. В связи с этим представлялось целесообразным исследовать возможное участие элементов цитоскелета и механизма везикулярного транспорта в регуляции Ca^{2+} -сигналов, в особенности депозависимого входа Ca^{2+} , в макрофагах.

Ранее на перитонеальных макрофагах крысы нами было показано, что агенты, нарушающие структуру микротрубочек (винбластин, колхицин и колцемид) и активных микрофиламентов (цитохалазин и фаллоидин), существенно уменьшают фазу мобилизации Ca^{2+} из депо и практически полностью подавляют депозависимый вход Ca^{2+} , индуцированный ингибиторами эндоплазма-

тических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином и циклопязониковой кислотой (Крутецкая и др., 2001). Данные результаты могут свидетельствовать в пользу моделей «конформационного связывания», встраивания везикул в плазматическую мембрану или модели связывания по типу секретиции.

Целью настоящего исследования являлось изучение влияния новых эффективных агентов, вызывающих реорганизацию элементов цитоскелета, — деполимеризатора микрофиламентов латрункулина В и стабилизатора микрофиламентов джасплакинолида, а также ингибитора везикулярного транспорта брефельдина А — на депозависимый вход Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги и определение действующей модели «емкостного» входа Ca^{2+} в данном типе клеток.

Материал и методика

Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крысы. Кварцевые стекла с клетками помещали в экспериментальную камеру, заполненную физиологическим раствором следующего ионного состава (в мМ): NaCl — 140, KCl — 5, CaCl_2 — 1, MgCl_2 — 1 и HEPES-NaOH — 5, pH 7.3—7.4 (Alonso-Torre, Trautmann, 1993). Бескальциевая среда содержала 0 мМ CaCl_2 и 1 мМ ЭГТА. Подробно процедура культивирования макрофагов описана ранее (Крутецкая и др., 1997).

В опытах использовали реактивы фирмы Sigma (США). Маточные растворы тапсигаргина (500 мкМ), циклопязониковой кислоты (2 мМ), брефельдина А (50 мМ), латрункулина В (5 мМ) и джасплакинолида (2 мМ) готовили в диметилсульфоксиде. Маточные растворы АТФ (100 мМ) и УТФ (100 мМ) готовили на воде.

Для измерения внутриклеточной концентрации кальция ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) использовали флуоресцентный зонд Fura-2АМ. Макрофаги инкубировали в течение 45 мин в физиологическом растворе, содержащем 2 мкМ Fura-2АМ, при комнатной температуре. Стекла с окрашенными клетками отмывали физиологическим раствором и переносили в экспериментальную камеру, расположенную на столике люминесцентного микроскопа «Люмам-КФ». Флуоресценцию Fura-2 возбуждали при 337 нм с помощью азотного лазера ЛГИ-503. Лазер располагали сбоку от микроскопа под углом 30° к экспериментальной камере, что позволяло направить луч лазера непосредственно на объект. Интенсивность флуоресценции регистрировали с помощью спектрофотонасадки СФН-10 при длине волны 510 нм. Сигнал с ФЭУ-79 усиливали специально сконструированным усилителем и регистрировали на компьютере IBM PC с использованием оригинального программного обеспечения. В экспериментах использовали объектив 10×0.40 . При данном увеличении в площадь фотометрируемого участка попадало 40—50 клеток. Для избежания фотовыгорания измерения проводили через каждые 20 с с облучением объекта в течение 2.5 с. При добавлении АТФ и УТФ клетки облучали непрерывно до достижения максимума флуоресценции. Значения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ рассчитывали по уравнению Гринкевича (Grynkiewicz et al., 1985).

Эксперименты проводили при комнатной температуре (22—24 °С) на 2—3-и сут культивирования клеток.

Результаты и обсуждение

Добавление к перитонеальным макрофагам 200 мкМ АТФ или УТФ вызывает двухфазный Ca^{2+} -сигнал: кратковременный пик, связанный с мобилизацией Ca^{2+} из депо, и выраженное длительное «плато» (рис. 1, а, в). В случае добавления АТФ оно отражает, по-видимому, одновременную активацию пуринорецепторов P_{2u} - и P_{2z} -типов. Другой пуринергический агонист — УТФ — связывается только с рецепторами P_{2u} -типа и стимулирует

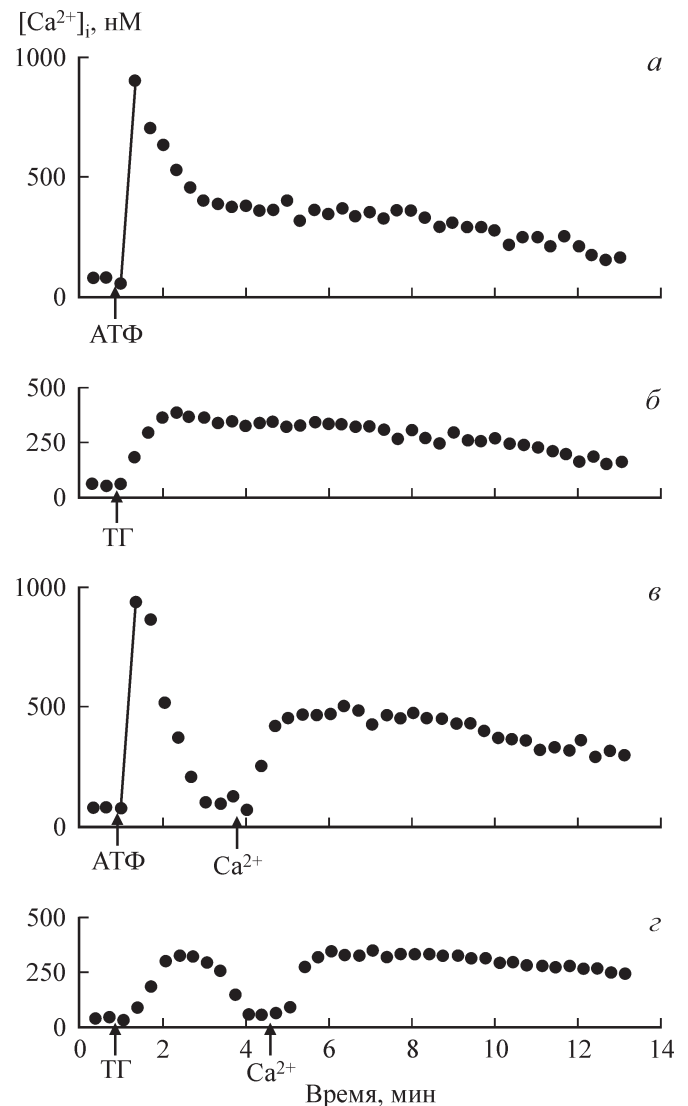


Рис. 1. Ca^{2+} -сигналы, индуцированные АТФ (а, в) и тапсигаргином (ТГ; б, г), в перитонеальных макрофагах.

Здесь и на рис. 2—4: по оси абсцисс — время, мин; по оси ординат — концентрация Ca^{2+} в цитозоле, нМ. а, б — клетки стимулировали 200 мкМ АТФ (а) или 0.5 мкМ ТГ (б) в нормальном физиологическом растворе; в, г — клетки стимулировали 200 мкМ АТФ (в) или 0.5 мкМ ТГ (г) в номинально бескальциевой среде, вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} .

Fig. 1. Ca^{2+} -signals induced by ATP (а, в) and thapsigargin (ТГ; б, г) in peritoneal macrophages.

Abscissa — time, min; ordinate — intracellular Ca^{2+} concentration, $[\text{Ca}^{2+}]_i$, nM. а, б — macrophages were stimulated with 200 μM ATP (а) or 0.5 μM TG (б) in normal physiological solution; в, г — cells were stimulated with 200 μM ATP (в) or 0.5 μM TG (г) in Ca^{2+} -free solution, and 2—3 min later 2 mM Ca^{2+} was added to the external medium to initiate Ca^{2+} entry.

ет вход Ca^{2+} , обусловленный, вероятно, опустошением депо (Alonso-Torre, Trautmann, 1993).

Специфические ингибиторы эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргин (0.5 мкМ) (Thastrup et al., 1989) и циклопязониковая кислота (10 мкМ) (Goeger et al., 1988) также вызывают двухфазный Ca^{2+} -сигнал: менее быстрый и не очень выраженный пик, связанный с мобилизацией Ca^{2+} из депо, и длительную фазу, отражающую депозависимый вход Ca^{2+} из наружной среды (рис. 1, б, з).

В исследованиях использовали два экспериментальных подхода. При первом исследовали влияние фармакологических агентов на Ca^{2+} -ответ, вызываемый АТФ, УТФ, тапсигаргином или циклопязониковой кислотой (ЦПК) в макрофагах, находящихся в нормальном физиологическом растворе. Агенты вводили либо до действия агонистов, либо после, во время фазы плато Ca^{2+} -сигнала, отражающей вход Ca^{2+} из наружной среды. Во втором варианте опытов для выявления и усиления входа Ca^{2+} в клетки использовали следующую схему эксперимента. Макрофаги инкубировали в номинально бескальциевой среде, затем на них действовали одним из агонистов, вызывая мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных депо. После добавления в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} и восстановления физиологического градиента концентрации Ca^{2+} наблюдалось быстрое повышение $[Ca^{2+}]_i$, отражающее вход Ca^{2+} в клетку. Фармакологические агенты добавляли до введения агонистов, до введения Ca^{2+} или во время развивающегося входа Ca^{2+} из наружной среды.

В последние годы идентифицированы новые высокоэффективные агенты, вызывающие реорганизацию актиновых филаментов, например латрункулин В. Латрункулин В хорошо проникает через мембрану и ингибирует полимеризацию актиновых филаментов, связываясь с мономерами актина (Spector et al., 1983).

В работе исследовали влияние на вход Ca^{2+} латрункулина В в концентрации 5 мкМ, поскольку на тромбоцитах человека показано, что латрункулин А в концентрации 5 мкМ уменьшает содержание F-актина в стимулированных тапсигаргином клетках и подавляет депозависимый вход Ca^{2+} (Rosado et al., 2000). Нами показано, что латрункулин В (5 мкМ) не влияет на фазу мобилизации Ca^{2+} из депо, но оказывает существенное влияние на депозависимый вход Ca^{2+} , индуцированный пуринергическими агонистами или ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз, в макрофагах. На рис. 2, а представлено влияние латрункулина В на Ca^{2+} -сигналы, индуцированные тапсигаргином, в перитонеальных макрофагах. Клетки предварительно инкубировали в течение 1 мин с 5 мкМ латрункулина В в номинально бескальциевой среде, после чего клетки стимулировали 0.5 мкМ тапсигаргина. После окончания фазы мобилизации Ca^{2+} из депо вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} . При этом наблюдали некоторое (на 20 %) первоначальное увеличение входа Ca^{2+} в макрофаги. В то же время при более длительной (25 мин) преинкубации макрофагов с 5 мкМ латрункулина В происходило практически полное подавление входа Ca^{2+} , индуцированного тапсигаргином (рис. 2, б). Сходное влияние оказывал латрункулин В (5 мкМ) на вход Ca^{2+} , индуцированный АТФ или УТФ. На рис. 2, в, з представлены данные о влиянии латрункулина В на Ca^{2+} -сигналы, индуцированные АТФ. В первом случае макрофаги предварительно инкубировали в течение 20 мин с 5 мкМ латрункулина В в бескальциевой среде (рис. 2, в). Затем клетки активировали введением

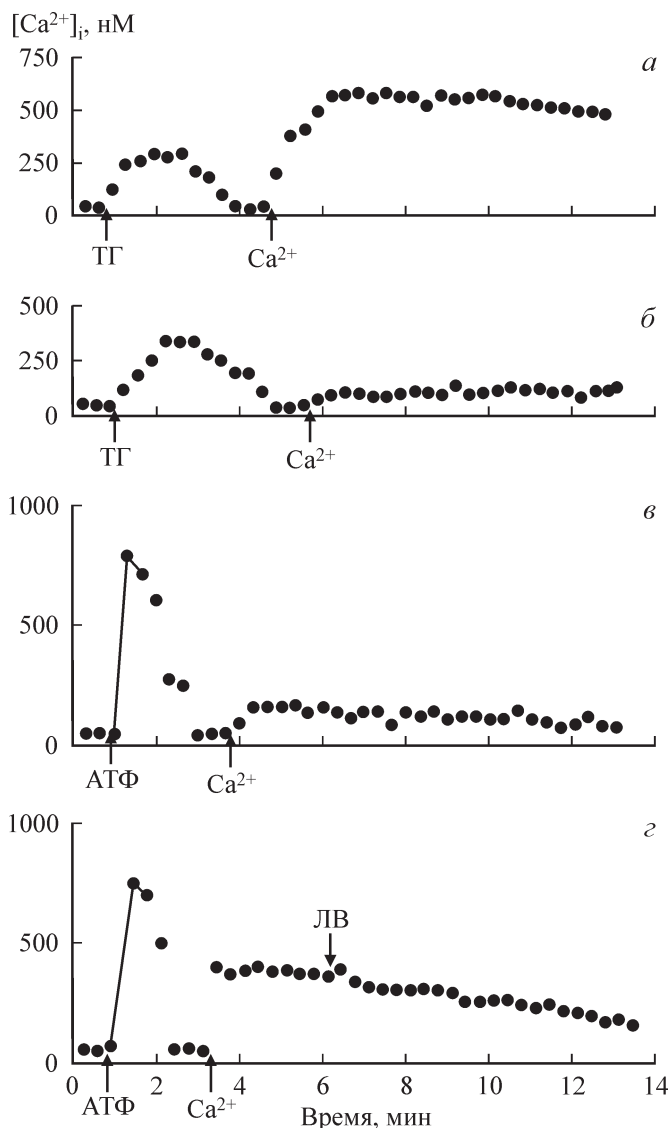


Рис. 2. Влияние латрункулина В (ЛВ) на Ca^{2+} -сигналы, вызванные АТФ или тапсигаргином, в макрофагах.

а—в — клетки предварительно инкубировали с 5 мкМ ЛВ в течение 1 (а), 25 (б) или 20 (в) мин, затем добавляли 0.5 мкМ ТГ (а, б) или 200 мкМ АТФ (в) в Ca^{2+} -свободном растворе и затем 2 мМ Ca^{2+} было добавлено в среду для инициирования Ca^{2+} входа; з — макрофаги были стимулированы 200 мкМ АТФ в Ca^{2+} -свободном растворе и 2—3 мин спустя 2 мМ Ca^{2+} было добавлено в внешнюю среду; 5 мкМ ЛВ добавляли во время развивающегося входа Ca^{2+} .

Fig. 2. Effect of latrunculin B (LB) on ATP- or thapsigargin-evoked Ca^{2+} -signals in macrophages.

а—в — cells were preincubated with 5 μM LB for 1 (a), 25 (b) or 20 (v) min after that macrophages were stimulated with 0.5 μM TG (a, b) or 200 μM ATP (v) in Ca^{2+} -free solution and then 2 mM Ca^{2+} was added to the medium to initiate Ca^{2+} entry; z — macrophages were stimulated with 200 μM ATP in Ca^{2+} -free solution and 2—3 min later 2 mM Ca^{2+} was added to the external medium; 5 μM LB was added during the phase of developed Ca^{2+} entry.

200 мкМ АТФ и после окончания фазы мобилизации Ca^{2+} из депо вход Ca^{2+} индуцировали добавлением 2 мМ Ca^{2+} в наружную среду. Видно, что вход Ca^{2+} практически полностью подавлен. Добавление латрункулина В на фоне развивающегося входа Ca^{2+} (рис. 2, з) приводит к постепенному снижению $[Ca^{2+}]_i$, и это свидетельствует о том, что латрункулин В подавляет также и уже развившийся вход Ca^{2+} в макрофаги.

Таким образом, нами обнаружено, что латрункулин В, вызывающий деполимеризацию актиновых филаментов, не влияет на фазу мобилизации Ca^{2+} из депо, но оказывает существенное влияние на депозависимый вход Ca^{2+} в макрофаги. Эффект латрункулина В зависит от времени воздействия. При кратковременной (1—5 мин) инкубации макрофагов с латрункулином В до воздействия агонистов наблюдается увеличение на 20—30 % фазы входа Ca^{2+} . Можно предположить, что при малом времени воздействия латрункулин В вызывает реорганизацию примембранного актина и облегчает взаимодействие Ca^{2+} -депо с депозависимыми Ca^{2+} -каналами в плазматической мембране. Напротив, при длительной (20—30 мин) инкубации клеток с латрункулином В происходит практически полное подавление фазы входа Ca^{2+} в макрофаги. По-видимому, при длительном воздействии латрункулина В происходит полная разборка актиновых филаментов, и вспомогательная роль актинового цитоскелета в процессе взаимодействия Ca^{2+} -депо с плазматической мембраной становится невозможной. Кроме того, латрункулин В не только предотвращает активацию депозависимого входа Ca^{2+} , но и подавляет уже развившийся вход Ca^{2+} , индуцированный ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз или пуринергическими агонистами. Это согласуется с результатами исследований, выявивших важную роль структур цитоскелета в модуляции активности различных типов ионных каналов клеток (Negulyaev et al., 1996; Gomez et al., 2000), и свидетельствует об участии актинового цитоскелета не только в активации, но и в поддержании депозависимого входа Ca^{2+} в макрофаги.

Полученные результаты согласуются с данными, полученными на клетках других типов. Так, ингибирование полимеризации актина при действии латрункулина А оказывает зависящее от времени влияние на депозависимый вход Ca^{2+} в тромбоциты человека. Как и в случае перитонеальных макрофагов, кратковременная (1 мин) преинкубация приводит к потенциации входа Ca^{2+} , в то время как длительная (1 ч) преинкубация вызывает значительное (на 70 %) подавление депозависимого входа Ca^{2+} , индуцированного тапсигаргином (Rosado et al., 2000; Rosado, Sage, 2000). В последующей работе авторы показали, что латрункулин А увеличивает вход Ca^{2+} , вызванный опустошением 2,5-ди-(трет-бутил)-1,4-гидрохинон (ТВНҚ)-чувствительного Ca^{2+} -депо, и подавляет вход Ca^{2+} , индуцированный опустошением ТВНҚ-нечувствительного депо (Rosado et al., 2004).

В гладкомышечных клетках мочевого пузыря морской свинки латрункулин А увеличивает депозависимый вход Ca^{2+} , индуцированный тапсигаргином, в то время как джасплакинолид его подавляет (Morales et al., 2005). В ацинарных клетках поджелудочной железы мыши ингибирование полимеризации актиновых филаментов при действии латрункулина А и цитохалазина D предотвращает активацию депозависимого входа Ca^{2+} , а также подавляет уже развившийся вход Ca^{2+} (Redondo et al., 2003). Авторы интерпретируют полученные данные в рамках модели «связывание по типу секреции» (Rosado et al., 2000; Rosado, Sage, 2000; Redondo et al., 2003) или модели «конформационного связывания» (Morales et al., 2005).

В наших экспериментах на перитонеальных макрофагах крысы показано, что деполимеризация актиновых филаментов при длительном действии латрункулина В предотвращает активацию депозависимого входа

Ca^{2+} , вызванного ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз и пуринергическими агонистами, а также подавляет уже развившийся вход Ca^{2+} . Таким образом, в перитонеальных макрофагах нативная функциональная организация актиновых филаментов необходима не только для активации, но и для поддержания депозависимого входа Ca^{2+} .

Известно, что кортикальный актин препятствует экзоцитозу и что разборка этих актиновых филаментов при действии цитохалазина D увеличивает стимулируемую секрецию, способствуя подходу секреторных гранул к плазмалемме (Muallem et al., 1995). Этим можно объяснить потенциацию депозависимого входа Ca^{2+} после кратковременной преинкубации макрофагов с латрункулином В. Вероятно, латрункулин В вначале вызывает деполимеризацию подмембранных микрофиламентов, облегчая тем самым связывание ЭР с плазмалеммой.

Таким образом, эксперименты с использованием латрункулина В подтверждают модель «связывание по типу секреции» для макрофагов.

В модели «связывание по типу секреции» актиновый цитоскелет, расположенный под плазмалеммой, играет ключевую роль в регуляции входа Ca^{2+} , подобно тому как это происходит при секреции. Образование плотного слоя кортикального актина препятствует входу Ca^{2+} , действуя в качестве физического барьера, который предотвращает связывание ЭР с плазматической мембраной и последующее конформационное взаимодействие между IP_3 -рецептором в мембране ЭР и Ca^{2+} -каналом в плазмалемме.

Удобным инструментом для изучения роли кортикального актина в активации и регуляции депозависимого входа Ca^{2+} является джасплакинолид, выделяемый из морской губки *Jaspis johnstoni*. Это хорошо проникающий через мембрану пептид, вызывающий полимеризацию и стабилизацию актиновых филаментов (Bubb et al., 1994). На клетках скелетных мышц кролика установлено, что джасплакинолид индуцирует полимеризацию и стабилизацию преимущественно кортикальных актиновых филаментов (Cooper, 1987; Patterson et al., 1999), при этом он связывается с теми же участками микрофиламентов, что и фаллоидин (Bubb et al., 1994; Vakowski et al., 2001).

На рис. 3 представлено влияние 10 мкМ джасплакинолида на Ca^{2+} -сигналы, индуцированные УТФ в макрофагах. После стимуляции макрофагов 200 мкМ УТФ в среде, не содержащей Ca^{2+} , вход Ca^{2+} вызывали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} . Показано, что предварительная инкубация клеток с 10 мкМ джасплакинолида в течение 30 мин до воздействия УТФ не влияет на фазу мобилизации Ca^{2+} из депо, но приводит к значительному (на 80—90 %) подавлению депозависимого входа Ca^{2+} (рис. 3, а). Сходное влияние оказывает джасплакинолид на фазы Ca^{2+} -сигналов, вызванных тапсигаргином или ЦПК (не показано). Полученные данные свидетельствуют о том, что джасплакинолид не влияет на мобилизацию Ca^{2+} из депо, а также о том, что образование плотного слоя кортикального актина препятствует связыванию Ca^{2+} -депо с плазмалеммой.

Для выяснения роли актиновых филаментов в поддержании депозависимого входа Ca^{2+} было исследовано влияние джасплакинолида на уже активированные опустошением депо механизмы входа Ca^{2+} в макрофаги. В опыте, представленном на рис. 3, б, макрофаги вначале стимулировали 200 мкМ УТФ в номинально бескаль-

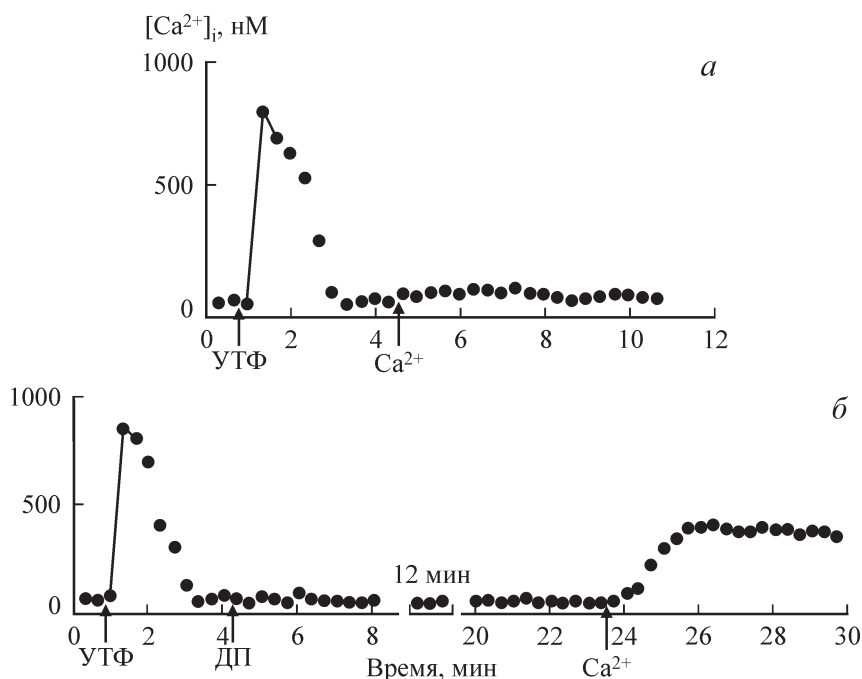


Рис. 3. Влияние джасплакинолида (ДП) на Ca^{2+} -сигналы, индуцированные УТФ, в перитонеальных макрофагах.

a — клетки инкубировали с 10 мкМ ДП в течение 30 мин, затем активировали 200 мкМ УТФ в номинально бескальциевой среде, вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; *б* — клетки инкубировали с 10 мкМ ДП в течение 20 мин после действия УТФ и до введения 2 мМ Ca^{2+} в наружную среду.

Fig. 3. Effect of jasplakinolide (JP) on UTP-evoked Ca^{2+} -signals in peritoneal macrophages.

a — macrophages were preincubated with 10 μ M JP for 30 min, then stimulated with 200 μ M UTP in Ca^{2+} -free solution, after that 2 mM Ca^{2+} was added to the external medium to initiate Ca^{2+} entry; *b* — macrophages were stimulated with 200 μ M UTP, and then incubated for 20 min with 10 μ M JP, later on 2 mM Ca^{2+} was added to the external medium to initiate Ca^{2+} entry.

циевой среде. После окончания фазы мобилизации Ca^{2+} из депо, вызванной УТФ, клетки инкубировали с 10 мкМ джасплакинолида в течение 20 мин до введения 2 мМ Ca^{2+} . Видно, что в данных условиях джасплакинолид практически не влияет на вход Ca^{2+} .

Таким образом, нами показано, что джасплакинолид предотвращает активацию депозависимого входа Ca^{2+} , но не влияет на вход Ca^{2+} , после того как процессы, приводящие к активации депозависимого входа Ca^{2+} , уже были запущены опустошением депо. Сходные данные получены на тромбоцитах человека (Rosado et al., 2000, 2002, 2004; Rosado, Sage, 2000, 2001), гладкомышечных клетках мочевого пузыря морской свинки (Morales et al., 2005), ацинарных клетках поджелудочной железы мыши (Redondo et al., 2003) и гладкомышечных клетках линий DDT₁ MF-2 и A7r5 (Patterson et al., 1999). Так, на тромбоцитах человека показано, что стабилизация кортикального актина при действии джасплакинолида ингибирует вызываемое тапсигаргином или тромбином связывание между IP_3 -рецептором и hTrp1-каналом и депозависимый вход Ca^{2+} , что свидетельствует о том, что, как и в случае секреции, подмембранные актиновые филаменты выступают в качестве физического барьера, препятствующего связыванию между IP_3 -рецептором II типа и hTrp1-каналом (Rosado, Sage, 2001; Rosado et al., 2002). В последующей работе авторы показали, что джасплакинолид существенно подавляет депозависимый вход Ca^{2+} , индуцированный опустошением ТВНҚ-чувствительных и ТВНҚ-нечувствительных Ca^{2+} -депо в тромбоцитах, и это позволяет предположить, что кортикальный актин должен

быть реорганизован после опустошения депо для облегчения подхода Ca^{2+} -депо к плазмалемме (Rosado et al., 2004).

В то же время джасплакинолид не влияет на активацию стас-каналов в лейкомиических базофилах крысы линии RBL-1 (Bakowski et al., 2001). Различия во влиянии джасплакинолида и других агентов, вызывающих реорганизацию актиновых филаментов, на депозависимый вход Ca^{2+} в клетках разных типов, могут быть связаны с различной организацией актинового цитоскелета в этих клетках. В макрофагах (Reaven, Axline, 1973; Amato et al., 1983), тромбоцитах человека (Hartwig, 1992; Rosado, Sage, 2000), эндотелиальных клетках сосудов (Holida, Blatter, 1997) и ацинарных клетках поджелудочной железы (Redondo et al., 2003) актиновые филаменты локализованы преимущественно на периферии клеток в виде подмембранного цитоскелета. В то же время в гладкомышечных клетках, фибробластах NIH 3T3 и других клетках имеется разветвленная сеть актиновых филаментов (Pedrosa-Ribeiro et al., 1997; Patterson et al., 1999). Следовательно, для связывания ЭР с плазмалеммой и активации депозависимого входа Ca^{2+} необходима реорганизация кортикального актина в клетках не всех типов.

В модели «связывание по типу секреции» кортикальный F-актин предотвращает активацию депозависимого входа Ca^{2+} , подобно тому как при экзоцитозе подмембранный актин препятствует подходу секреторных гранул к мембране (Muallem et al., 1995). В соответствии с этим джасплакинолид, специфически стабилизирующий кор-

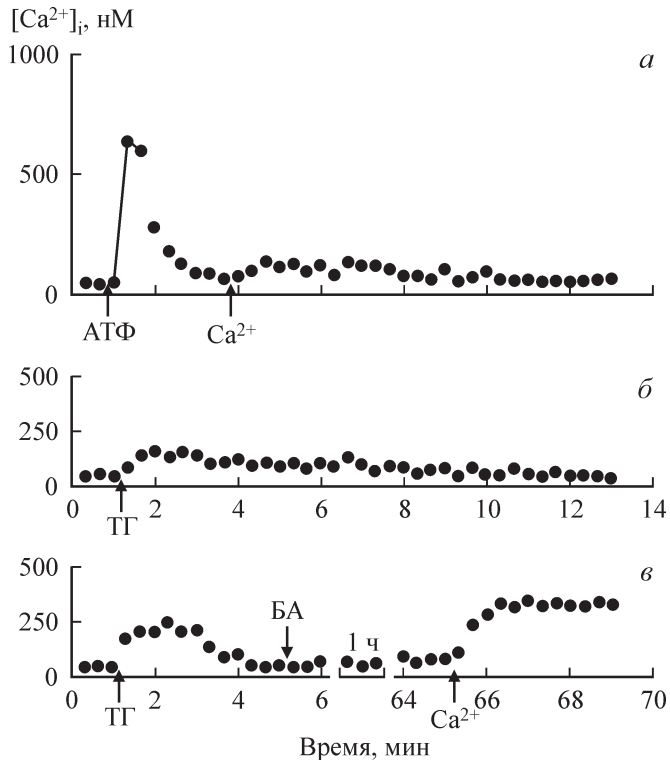


Рис. 4. Влияние брэфельдина А (БА) на Ca^{2+} -сигналы, индуцированные АТФ или тапсигаргином, в макрофагах.

a — клетки инкубировали в течение 1 ч с 50 мкМ БА, затем активировали 200 мкМ АТФ, после чего вход Ca^{2+} индуцировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; *б* — макрофаги, находящиеся в нормальном физиологическом растворе, инкубировали в течение 1 ч с 50 мкМ БА, затем стимулировали 0.5 мкМ ТГ; *в* — клетки активировали 0.5 мкМ ТГ, затем инкубировали в течение 1 ч с 50 мкМ БА, после чего вводили 2 мМ Ca^{2+} в номинально бескальциевую среду.

Fig. 4. Effect of brefeldin A (BA) on ATP- or thapsigargin-evoked Ca^{2+} -signals in macrophages.

a — macrophages were preincubated for 1 h with 50 μM BA and then stimulated with 200 μM ATP, 3 min later 2 mM Ca^{2+} was added to the medium to initiate Ca^{2+} entry; *b* — macrophages were preincubated for 1 h with 50 μM BA in normal physiological solution and then stimulated with 0.5 μM TG; *c* — macrophages were stimulated with 0.5 μM TG, and then incubated for 1 h with 50 μM BA before addition of 2 mM Ca^{2+} to the external medium to initiate Ca^{2+} entry.

тикальный актиновый цитоскелет, предотвращает вход Ca^{2+} , индуцированный пуринаргическими агонистами и ингибиторами Ca^{2+} -АТФаз, в макрофагах. Джасплакинолид ингибирует емкостной вход Ca^{2+} , образуя плотный слой подмембранного актина, который вытесняет органеллы из этой области и предотвращает взаимодействие между плазмалеммой и внутриклеточными органеллами, как это было ранее показано для процессов секреции (Shurety et al., 1998).

Таким образом, эксперименты с использованием джасплакинолида подтверждают то, что стабилизация кортикального актина препятствует активации, но не поддержанию депозависимого входа Ca^{2+} , и свидетельствуют в пользу модели «связывание по типу секреции» для перитонеальных макрофагов.

Для выяснения механизма депозависимого входа Ca^{2+} было изучено влияние ингибитора везикулярного транспорта брэфельдина А, который инактивирует малые G-белки семейства arf (Fernando et al., 1997), играю-

щие ключевую роль в регуляции везикулярного транспорта в клетках (Moss, Vaughan, 1999).

Нами показано, что предварительная инкубация клеток с 50 мкМ брэфельдина А в течение 1 ч до введения АТФ или тапсигаргина приводит к практически полному подавлению входа Ca^{2+} в макрофаги (рис. 4, *a*, *б*). Обработка макрофагов брэфельдином А в течение 1 ч после активации клеток тапсигаргином не влияет на вход Ca^{2+} , индуцированный введением 2 мМ Ca^{2+} в наружную среду (рис. 4, *в*), и это может свидетельствовать о том, что механизм, сходный с везикулярным транспортом, необходим для активации, но не для поддержания емкостного входа в макрофагах.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об участии arf-белков — обязательных составляющих механизма везикулярного транспорта — в активации депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах.

Везикулярный транспорт как часть механизма депозависимого входа Ca^{2+} показан также на клетках других типов. Так, предварительная инкубация эндотелиальных клеток роговицы быка с брэфельдином А (100 мкМ) не влияет на фазу мобилизации Ca^{2+} из депо, но практически полностью подавляет депозависимый вход Ca^{2+} , индуцированный ЦПК (Xie et al., 2002). В тромбоцитах человека брэфельдин А (100 мкМ) предотвращает активацию депозависимого входа Ca^{2+} , но не влияет на уже развившийся вход Ca^{2+} . Кроме того, брэфельдин А не оказывает влияния на мобилизацию Ca^{2+} из депо, вызванную тапсигаргином (Rosado et al., 2000; Rosado, Sage, 2000). В гепатоцитах крысы брэфельдин А (18 мкМ) ингибирует депозависимый вход Ca^{2+} , индуцированный тапсигаргином, ЦПК или вазопрессинном. Предполагают, что малый G-белок (по-видимому, arf-белок) необходим для активации емкостного входа Ca^{2+} и способствует локализации участков ЭР в непосредственной близости к депозависимым Ca^{2+} -каналам в плазмалемме (Fernando et al., 1997). В то же время брэфельдин А не влияет на депозависимый вход Ca^{2+} в ооцитах *Xenopus* (Yao et al., 1999) и клетках гепатомы крысы (Auld et al., 2000) и только частично подавляет емкостной вход в клетках линии НЕК 293 (Alderton et al., 2000). Разная чувствительность депозависимого входа Ca^{2+} к действию брэфельдина А в различных клетках может быть связана с существованием в клетках резервного пула везикул, содержащих депозависимые Ca^{2+} -каналы, или с существованием параллельных путей везикулярного транспорта, в которых участвуют чувствительные и не чувствительные к брэфельдину А arf-белки (Alderton et al., 2000).

Исследование влияния агентов, вызывающих реорганизацию актиновых филаментов и ингибирующих везикулярный транспорт, на активацию и поддержание депозависимого входа Ca^{2+} позволяет высказать предположение о механизме (действующей модели) емкостного входа Ca^{2+} в макрофаги. Нами показано, что актиновые филаменты и G-белки малой молекулярной массы семейства arf, необходимые для механизма везикулярного транспорта в целом, являются важными регуляторными участниками депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах. Реорганизация элементов цитоскелета может участвовать в процессе транслокации Ca^{2+} -депо к плазматической мембране, arf-белки также вовлечены в этот процесс. С другой стороны, реорганизация цитоскелета, расположенного непосредственно под плазмалеммой клетки, может регулировать связывание между IP_3 -рецептором и депозависимым Ca^{2+} -каналом в плазматиче-

ской мембране. На основании полученных результатов можно заключить, что наиболее вероятной моделью емкостного входа Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги крысы является модель «связывание по типу секреции», предполагающая обратимую транслокацию ЭР к плазматической мембране.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 03-04-49091) и Министерства образования РФ (грант 4681; 2005).

Список литературы

- Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Крутецкая Н. И., Курилова Л. С. 2001. Роль структур цитоскелета в регуляции Ca^{2+} -ответов в макрофагах. Цитология. 43 (1) : 61—71.
- Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Тюшев В. Е., Крутецкая Н. И., Рощина Н. Г. 1997. Влияние ингибиторов тирозинкиназ и тирозинфосфатаз на вход Ca^{2+} , индуцируемый АТФ и тапсигаргином, в перитонеальных макрофагах крысы. Цитология. 39 (2/3) : 164—176.
- Alderton J. M., Ahmed S. A., Smith L. A., Steinhardt R. A. 2000. Evidence for a vesicle-mediated maintenance of store-operated calcium channels in a human embryonic kidney cell line. Cell Calcium. 28 : 161—169.
- Alonso-Torre S. R., Trautmann A. 1993. Calcium responses elicited by nucleotides in macrophages. Interaction between two receptor subtypes. J. Biol. Chem. 268 : 18 640—18 647.
- Amato P. A., Unanue E. R., Taylor D. L. 1983. Distribution of actin in spreading macrophages: a comparative study on living and fixed cells. J. Cell Biol. 96 : 750—761.
- Auld A., Chen J., Brereton H. M., Wang Y. J., Gregory R. B., Barritt G. J. 2000. Store-operated Ca^{2+} inflow in Reuber hepatoma cells is inhibited by voltage-operated Ca^{2+} channel antagonists and, in contrast to freshly isolated hepatocytes, does not require a pertussis toxin-sensitive trimeric GTP-binding protein. Biochim. biophys. acta. 1497 : 11—26.
- Bakowski D., Glitsch M. D., Parekh A. B. 2001. An examination of the secretion-like coupling model for the activation of the Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} current I_{crac} in RBL-1 cells. J. Physiol. 532 : 55—71.
- Berridge M. J. 1995. Capacitative calcium entry. Biochem. J. 312 : 1—11.
- Bubb M. R., Senderowicz A. M., Sausville E. A., Duncan K. L., Korn E. D. 1994. Jaspilkinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin. J. Biol. Chem. 269 : 14 869—14 871.
- Cooper J. A. 1987. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. J. Cell Biol. 105 : 1473—1478.
- Fernando K. C., Grogory R. B., Katsis F., Kemp B. E., Barritt G. J. 1997. Evidence that a low-molecular-mass GTP-binding protein is required for store-activated Ca^{2+} inflow in hepatocytes. Biochem. J. 328 : 463—471.
- Goeger D. E., Riley R. T., Dorner J. W., Cole R. J. 1988. Cyclopiazonic acid inhibition of the Ca^{2+} transport ATPase in rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum vesicles. Biochem. Pharmacol. 37 : 978—981.
- Gomez A. M., Kerfant B. G., Vassort G. 2000. Microtubule disruption modulates Ca^{2+} signaling in rat cardiac myocytes. Circulation Res. 86 : 30—35.
- Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R. Y. 1985. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. J. Biol. Chem. 260 : 3440—3450.
- Hartwig J. H. 1992. Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation. J. Cell Biol. 118 : 1421—1442.
- Holda J. R., Blatter L. A. 1997. Capacitative calcium entry is inhibited in vascular endothelial cells by disruption of cytoskeletal microfilaments. FEBS Lett. 403 : 191—196.
- Morales S., Camello P. J., Rosado J. A., Mawe G. M., Pozo M. J. 2005. Disruption of the filamentous actin cytoskeleton is necessary for the activation of capacitative calcium entry in native smooth muscle cells. Cell Signalling. 17 : 635—645.
- Moss J., Vaughan M. 1999. Activation of toxin ADP-ribosyltransferases by eukaryotic ADP-ribosylation factors. Mol. Cell. Biochem. 193 : 153—157.
- Mualllem S., Kwiatkowska K., Xu X., Yin H. L. 1995. Actin filament disassembly is a sufficient final trigger for exocytosis in nonexcitable cells. J. Cell Biol. 128 : 589—598.
- Negulyaev Yu. A., Vedernikova E. A., Maximov A. V. 1996. Disruption of actin filaments increases the activity of sodium-conducting channels in human myeloid leukemia cells. Mol. Biol. Cell. 7 : 1857—1864.
- Parekh A. B. 2003. Store-operated Ca^{2+} entry: dynamic interplay between endoplasmic reticulum, mitochondria and plasma membrane. J. Physiol. 547 : 333—348.
- Parekh A. B., Putney J. W. 2005. Store-operated calcium channels. Physiol. Rev. 85 : 757—810.
- Patterson R. L., Van Rossum D. B., Gill D. L. 1999. Store-operated Ca^{2+} entry: evidence for a secretion-like coupling model. Cell. 98 : 487—499.
- Pedrosa-Ribeiro C. M., Reece J., Putney J. W., jr. 1997. Role of the cytoskeleton in calcium signaling in NIH 3TH cells. An intact cytoskeleton is required for agonist-induced $[Ca^{2+}]_i$ signaling, but not for capacitative calcium entry. J. Biol. Chem. 272 : 26 555—26 561.
- Putney J. W. 1990. Capacitative calcium entry revisited. Cell Calcium. 11 : 611—624.
- Putney J. W., Broad L. M., Braun F.-J., Lievreumont J.-P., Bird G. St. J. 2001. Mechanisms of capacitative calcium entry. J. Cell Sci. 114 : 2223—2229.
- Reaven E. P., Axline S. G. 1973. Subplasmalemmal microfilaments and microtubules in resting and phagocytizing cultivated macrophages. J. Cell Biol. 59 : 12—27.
- Redondo P. C., Lajas A. I., Salido G. M., Gonzales A., Rosado J. A., Pariente J. A. 2003. Evidence for secretion-like coupling involving pp60^{src} in the activation and maintenance of store-mediated Ca^{2+} -entry in mouse pancreatic acinar cells. Biochem. J. 370 : 255—263.
- Rosado J. A., Brownlow Sh. L., Sage St. O. 2002. Endogenously expressed Trp 1 is involved in store-mediated Ca^{2+} entry by conformational coupling in human platelets. J. Biol. Chem. 277 : 42 157—42 163.
- Rosado J. A., Jenner S., Sage St. O. 2000. A role for the actin cytoskeleton in the initiation and maintenance of store-mediated calcium entry in human platelets. J. Biol. Chem. 275 : 7527—7533.
- Rosado J. A., Lopez J. J., Harper A. G. S., Harper M. T., Redondo P. C., Pariente J. A., Sage S. O., Salido G. M. 2004. Two pathways for store-mediated calcium entry differentially dependent on the actin cytoskeleton in human platelets. J. Biol. Chem. 279 : 29 231—29 235.
- Rosado J. A., Sage St. O. 2000. The actin cytoskeleton in store-mediated calcium entry. J. Physiol. 526 : 221—229.
- Rosado J. A., Sage St. O. 2001. Activation of store-mediated calcium entry by secretion-like coupling between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type II and human transient receptor potential (hTrp 1) channels in human platelets. Biochem. J. 356 : 191—198.
- Shurety W., Stewart N. L., Stow J. L. 1998. Fluid-phase markers in the basolateral endocytic pathway accumulate in response to the actin assembly-promoting drug Jaspilkinolide. Mol. Biol. Cell. 9 : 957—975.
- Spector I., Shochet N. R., Kashman Y., Groweiss A. 1983. Latrunculin: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. Science. 219 : 493—495.
- Thastrup O., Dawson A. P., Scharff O., Foder B., Cullen P. J., Drobak B. K., Bjerrum P. J., Christensen S. B., Hanley M. R. 1989. Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. Agents Actions. 27 : 17—23.
- Xie Q., Zhang Y., Zhai Ch., Bonanno J. A. 2002. Calcium influx factor from cytochrome P-450 metabolism and secretion-like

coupling mechanisms for capacitative calcium entry in corneal endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 277 : 16 559—16 566.

Yao Y., Ferrer-Montiel A. V., Montal M., Tsien R. Y. 1999. Activation of store-operated Ca^{2+} -current in *Xenopus* oocytes requires SNAP-25 but not a diffusible messenger. *Cell.* 98 : 475—485.

Поступила 21 III 2006

EFFECT OF LATRUNCULIN B, JASPLAKINOLIDE AND BREFELDIN A
ON THE STORE-DEPENDENT Ca^{2+} ENTRY IN MACROPHAGES

L. S. Kurilova, Z. I. Krutetskaya, O. E. Lebedev

Chair of Biophysics, St. Petersburg State University; e-mail: cozy@mail.ru

Using Fura-2AM microfluorimetry, effect of actin filament modifiers and vesicular trafficking inhibitor on the store-dependent Ca^{2+} entry induced by purinergic agonists (ATP, UTP) and endoplasmic Ca^{2+} -ATPase inhibitors (thapsigargin, cyclopiazonic acid) in rat peritoneal macrophages was investigated. It was shown that inhibition of actin polymerization by latrunculin B had a biphasic time-dependent effect on Ca^{2+} entry, showing an initial potentiation followed by inhibition of Ca^{2+} entry. Moreover, addition of latrunculin B after induction of store-dependent Ca^{2+} entry inhibited the Ca^{2+} influx. Jaspilakinolide, which reorganizes actin filaments into a tight cortical layer adjacent to the plasma membrane, prevented activation of store-dependent Ca^{2+} entry but did not modify this process after its activation. Vesicular transport inhibitor brefeldin A, which inactivates arf proteins, inhibited activation of store-dependent Ca^{2+} entry but did not alter this mechanism once being initiated. These data are compatible with the secretion-like coupling model for store-dependent Ca^{2+} entry in macrophages based on a reversible trafficking and coupling of Ca^{2+} store with the plasma membrane.

Key words: peritoneal macrophages, store-dependent Ca^{2+} entry, microfilaments, vesicular transport inhibitor brefeldin A.