

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ В КЛЕТКАХ K562 ПОСЛЕ ЭКСТРАКЦИИ ХОЛЕСТЕРИНА

© А. В. Сударикова,¹ В. И. Чубинский-Надеждин, Ю. А. Негуляев, Е. А. Морачевская

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,

¹ *электронный адрес: nastya@mail.cytspb.rssi.ru*

Ранее показано, что активность потенциалнезависимых натриевых каналов в клетках лейкемии человека K562 зависит от состояния актинового цитоскелета. Согласно современным представлениям о латеральной гетерогенности клеточных мембран, богатые холестерином липидные микродомены (рафты) имеют важное значение для связи кортикального актина и интегральных мембранных белков, в том числе ионных каналов. В настоящей работе функциональные свойства натриевых каналов в клетках K562 исследовали при снижении содержания мембранного холестерина, т. е. в условиях деструкции рафтов. Для частичной экстракции холестерина клетки инкубировали с метил-бета-циклодекстрином (МБЦД), олигосахаридом, избирательно связывающим стеролы. С помощью метода патч-кламп регистрировали токи через натриевые каналы в участке мембраны нативной клетки и в изолированном мембранном фрагменте, обращенном цитоплазматической поверхностью в омывающий раствор. После инкубации с МБЦД (2.5 или 5.0 мМ) наблюдали активацию натриевых каналов при действии цитохалазина Б или Д как в целых клетках, так и в мембранных фрагментах. Биофизические характеристики натриевых каналов в клетках K562 с пониженным содержанием холестерина были близки к таковым в контроле, проводимость составляла 12 пСм. В опытах с глобулярным актином показано, что сборка филаментов на цитоплазматической стороне мембраны приводит к инактивации натриевых каналов в модифицированных клетках. Судя по имеющимся данным, натриевые каналы в клетках K562 не ассоциированы с богатыми холестерином мембранными микродоменами. Обсуждаются возможные механизмы взаимосвязи мембраны и цитоскелета.

Ключевые слова: плазматическая мембрана, натриевые каналы, цитоскелет, актин, холестерин, клетки лейкемии человека, цитохалазин, метил-бета-циклодекстрин.

Поступление катионов в цитоплазму из внеклеточной среды играет важную роль в поддержании водно-солевого баланса, а также в запуске и осуществлении процессов внутриклеточной передачи сигнала. Есть основания полагать, что кратковременные изменения мембранной проницаемости и пассивного транспорта натрия, кальция и, возможно, магния в электрически невозбудимых клетках, так же как и в электровозбудимых, связаны в первую очередь с активацией и инактивацией ионных каналов плазматической мембраны (Hille, 2001). К настоящему моменту в клетках различной специализации идентифицировано множество типов потенциалнезависимых ионных каналов. Физиологические механизмы регуляции их активности мало известны. Выяснение путей активации каналов в различных типах электровозбудимых клеток предполагает выявление возможного участия мембранных липидов и структур кортикального цитоскелета.

Ранее в клетках K562 нами описаны катионные каналы, характеризующиеся натриевой селективностью и отсутствием потенциалактивируемых воротных структур (Negulyaev et al., 1997; Ведерникова и др., 1999). Судя по биофизическим характеристикам, обнаруженные каналы близки к эпителиальным натриевым каналам и могут принадлежать к семейству DEG/ENaC (Corey, Garcia-Anovero, 1996). Показано, что активность потенциалнезависи-

мых натриевых каналов в клетках K562 зависит от состояния кортикального актинового цитоскелета (Negulyaev et al., 1996; Ведерникова и др., 1997). Вероятность нахождения каналов в открытом состоянии увеличивалась при фрагментации актиновых филаментов, ассоциированных с мембраной. Доказано, что полимеризация актина на цитоплазматической поверхности мембраны определяет переход каналов в закрытое состояние (Negulyaev et al., 2000). Однако эти данные оставляют открытым вопрос о том, каковы мембранные механизмы, связывающие уровень активности каналов с динамикой примембранного актина.

Согласно современным представлениям о латеральной гетерогенности липидного бислоя, важное значение для связи плазматической мембраны и кортикального цитоскелета имеют богатые холестерином липидные микродомены (рафты) (Brown, London, 2000; Nebl et al., 2002). Ряд данных свидетельствует о том, что ассоциация с рафтами может быть решающим фактором, определяющим активность интегральных мембранных белков, в том числе ионных каналов (см., например: Levitan et al., 2000; Shlyonsky et al., 2003). Многочисленные исследования последнего десятилетия демонстрируют, что целостность липидных рафтов необходима для работы большинства мембранных систем передачи сигнала (Brown, 2006). Со-

общается, что нарушения структуры и целостности рафтов, обусловленные снижением уровня мембранного холестерина, препятствуют реализации важнейших клеточных функций, включающих в себя в качестве ключевого звена перестройки актинового цитоскелета (Edidin, 2003). Поэтому мы обратились к изучению роли липидного окружения в функционировании натриевых каналов и их связи с состоянием кортикального цитоскелета.

Задача настоящей работы заключалась в исследовании функциональных свойств натриевых каналов в клетках лейкемии человека K562 при частичной экстракции мембранного холестерина, т. е. при нарушении целостности липидных микродоменов. В электрофизиологических экспериментах с использованием различных вариантов метода локальной фиксации потенциала (патч-кламп) оценивали характеристики каналов, уровень их активности и частоту встречаемости в клетках с пониженным уровнем холестерина. Центральным вопросом данного исследования — каким образом реализуется функциональная связь каналов с состоянием примембранного актина в условиях экстракции холестерина и предполагаемой деструкции рафтов. В частности, выясняли, имеет ли место активация каналов при разборке микрофиламентов. Адекватные экспериментальные подходы, включающие в себя использование цитохалазинов и глобулярного актина в экспериментах на инвертированных мембранных фрагментах, развиты в наших предшествующих работах (Negulyaev et al., 2000; Shumilina et al., 2003).

Материал и методика

К л е т к и миелоидной лейкемии человека K562, полученные из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН), культивировали на среде RPMI-1640 с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и 80 мкг/мл гентамицина. За 2—4 сут до опыта клетки высевали на покровные стекла 4×4 мм. Для снижения уровня мембранного холестерина клетки инкубировали в присутствии 2.5—5.0 мМ метил-бета-циклодекстрина (МбЦД) в среде RPMI-1640 без сыворотки в течение 1 ч (37 °С, 5 % CO₂). После отмывки реагента клетки оставляли в бессывороточной среде и использовали в экспериментах патч-кламп в течение 3—4 ч. Контрольными являлись клетки, переведенные на среду, не содержащую сыворотки и МбЦД.

Для регистрации ионных токов через одиночные каналы в плазматической мембране использовали метод патч-кламп в двух вариантах: 1) в конфигурации, называемой cell-attached (Hamill et al., 1981), т. е. при отведении токов от участка плазматической мембраны нативной клетки; 2) в конфигурации inside-out, т. е. от изолированного мембранного фрагмента. Токи измеряли с использованием высокоомного операционного усилителя (НЕКА ЕРС 8) в основном, как описано ранее (Negulyaev et al., 1996, 2000). Мембранный потенциал E определяли как потенциал раствора с внутренней стороны мембраны относительно наружного раствора. Записи токов вводили через 12-разрядный АЦП в компьютер для последующей обработки с помощью стандартных пакетов программ. Для количественной оценки уровня активности каналов в мембранном фрагменте использовали значение вероятности их открытого состояния $P_o = I/Ni$, где N — число работающих каналов в патче, I — средний ток для заданного временного интервала (рассчитывали из

амплитудных гистограмм), i — средний ток через открытый канал.

Р а с т в о р ы. Основной наружный раствор в регистрирующей пипетке и экспериментальной камере содержал (в мМ): 145 NaCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂ и 10 HEPES/Tris-OH. После образования гигаомного контакта для регистрации токов от мембраны неповрежденной клетки (вариант cell-attached) использовали «калиевый» внеклеточный раствор, содержащий (в мМ): 140 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂ и 10 HEPES/Tris-OH; при этих условиях потенциал покоя близок к нулю. В экспериментах inside-out в камеру подавали раствор, имитирующий внутриклеточный, содержащий (мМ): 140 KAspartate, 5 NaCl, 2 EGTA, 1 MgCl₂, 20 HEPES/TrisOH и соответствующее количество CaCl₂ (0.176 мМ) для установления свободной концентрации ионов кальция на уровне 0.01 мкМ (рСа 8). pH всех растворов поддерживали на уровне 7.3.

Цитохалазин D или B (Sigma, США) растворяли в DMSO и добавляли к внутриклеточному раствору до конечной концентрации 10 мкг/мл. Очищенный G-актин, выделенный из скелетных мышц кролика (Spudich, Watt, 1971), хранили в растворе низкой ионной силы (2 мМ Tris-HCl, 0.1 мМ CaCl₂, 0.2 мМ ATP и 0.02 % NaN₃, pH 7.5) и использовали в течение 4 сут. Аликвоту этого раствора добавляли в камеру с основным внутриклеточным раствором физиологической ионной силы до конечной концентрации 300 мкг/мл.

Результаты

Характеристики натриевых каналов в клетках K562 после инкубации с МбЦД. В контрольных экспериментах на клетках K562 мы наблюдали типичную активность потенциалнезависимых натриевых каналов, характеристики которых соответствовали полученным ранее (Ведерникова и др., 1997). Натриевые токи зарегистрированы в 14 % опытов ($n = 142$) на нативных клетках (cell-attached) и в 15 % опытов ($n = 97$) на мембранных фрагментах (inside-out); средние значения проводимости составляли 12.1 ± 0.7 и 10.8 ± 0.8 пСм соответственно. После инкубации клеток в среде без сыворотки, содержащей 2.5 или 5.0 мМ МбЦД, в экспериментах cell-attached и inside-out также были зарегистрированы токи входящего направления, отражающие функционирование натрийпроводящих каналов в плазматической мембране. Открывание каналов наблюдали при различных значениях поддерживаемого потенциала в диапазоне от -60 до +20 мВ. Активность натриевых каналов была обнаружена в 13 % экспериментов cell-attached ($n = 133$) и в 16 % inside-out ($n = 101$) на клетках с пониженным уровнем мембранного холестерина. Результаты типичного эксперимента, показанные на рис. 1, демонстрируют пример достаточно высокой фоновой активности потенциалнезависимых натриевых каналов в клетках K562. Среднее значение вероятности открытого состояния каналов (P_o), определенное для мембранного потенциала -30 мВ, составляло 0.42 ± 0.07 для клеток, модифицированных по липидному составу, и 0.39 ± 0.02 в контроле. Как следует из полученных данных, частота встречаемости и уровень фоновой активности каналов, оцененный как вероятность открытого состояния, в клетках с пониженным содержанием холестерина были близки к таковым в контроле. Вольт-амперная характеристика, построенная по амплитудам элементарных токов, может быть описана ли-

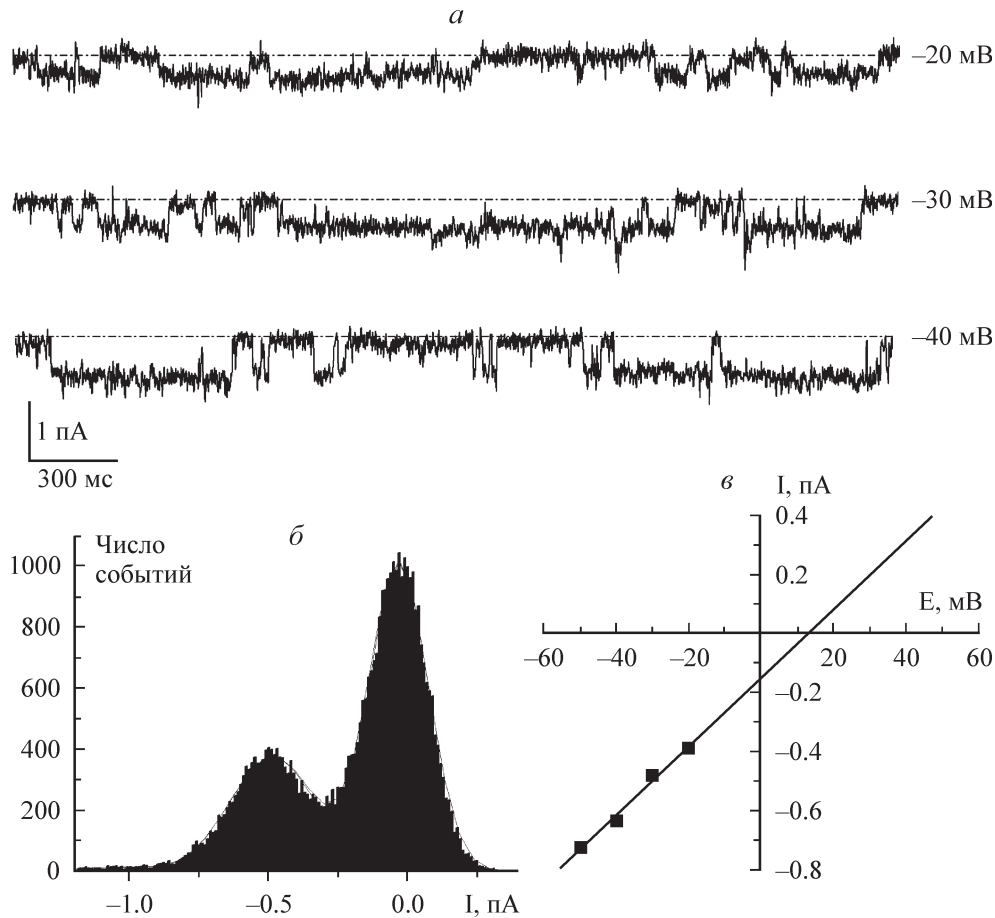


Рис. 1. Активность натриевых каналов в клетках K562 после частичной экстракции холестерина метил-бета-циклодекстрином (МБЦД, 2.5 мМ).

a — записи токов во фрагменте мембраны (inside-out) при различных значениях мембранного потенциала (указаны *справа*); *б* — амплитудная гистограмма, полученная для потенциала -30 мВ; расстояние между пиками соответствует амплитуде одиночного открывания (0.5 пА); *в* — вольт-амперная характеристика натриевых каналов (проводимость 11.6 пСм).

нейной регрессией первого порядка. В опытах на модифицированных клетках среднее значение проводимости одиночного канала составляло 12.1 ± 0.6 (cell-attached) и 11.1 ± 0.7 (inside-out) пСм. Значения потенциала реверсии, полученные путем экстраполяции, варьировали в диапазоне 10—20 мВ. Судя по полученным данным, частичная экстракция холестерина не приводила к существенным изменениям биофизических характеристик и уровня фоновой активности потенциалнезависимых натриевых каналов в клетках K562.

Активность натриевых каналов в зависимости от состояния актиновых филаментов. Ранее показано, что значительный рост активности натриевых каналов в клетках K562 наблюдается в условиях, способствующих разборке кортикального актинового цитоскелета (Negulyaev et al., 1996, 2000). Для изучения роли цитоскелета в регуляции каналов в клетках с пониженным содержанием холестерина мы использовали цитохалазин Б или цитохалазин Д, известные деструкторы актиновой сети. В первой серии опытов эффекты цитохалазина тестировали в экспериментах на изолированных фрагментах мембран (inside-out).

Важно отметить, что на начальном этапе работы было обнаружено, что активация натриевых каналов в ответ на разборку F-актина отсутствовала при нахождении клеток в среде без сыворотки в течение 12—24 ч. Поэтому дейст-

вие цитохалазина исследовали в экспериментах на контрольных и модифицированных клетках в течение 3—4 ч, избегая более длительного нахождения клеток в бессывороточной среде. Мы можем только предполагать, чем обусловлены наблюдаемые последствия снятия с сыворотки. Полученный результат, безусловно, интересен и, возможно, отражает связь функций натриевых каналов с регуляцией пролиферации и с фазами клеточного цикла. Однако этот круг вопросов требует специального внимания и выходит за рамки данного исследования.

В большинстве экспериментов фоновая активность каналов была низкой, вероятность открытого состояния приближалась к нулевому значению. Как подтвердили контрольные опыты, добавление как цитохалазина Б, так и цитохалазина Д к раствору, контактирующему с внутриклеточной стороной мембранного фрагмента (в дальнейшем будем называть его внутриклеточным раствором), вызывало активацию натриевых каналов (рис. 2, *a—в*). Во всех сериях экспериментов не было различий в действии цитохалазина Б или цитохалазина Д, поэтому в дальнейшем мы не всегда будем указывать, какой именно из двух агентов использовали. В норме типичную активацию каналов наблюдали в 18 % экспериментов ($n = 39$). Среднее значение проводимости составляло 11.9 ± 0.7 пСм, потенциала реверсии — 15.1 ± 1.7 мВ. В экспериментах на клетках K562 после инкубации их с МБЦД

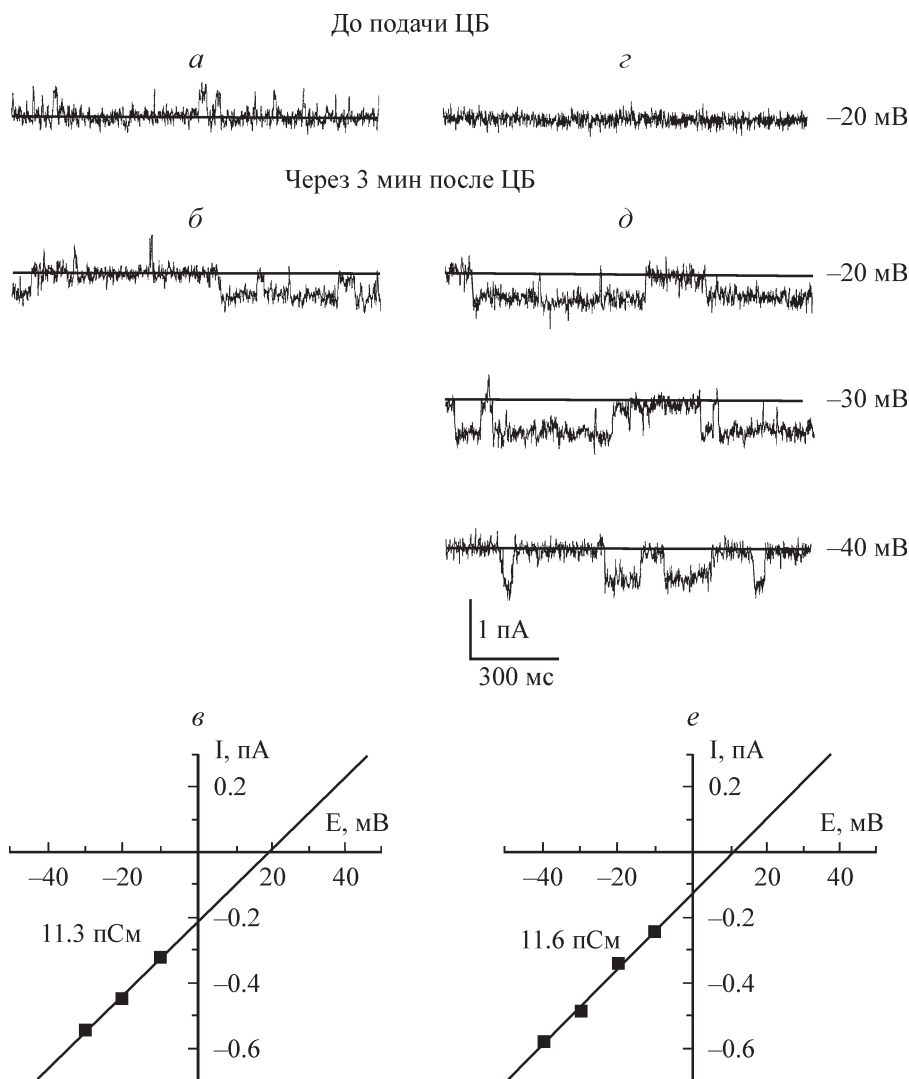


Рис. 2. Активация натриевых каналов при действии цитохалазина Б (ЦБ, 10 мкг/мл) в контрольном эксперименте (а—в) и после обработки клеток МБЦД (з—е).

а, з — запись тока (inside-out) при потенциале -20 мВ до подачи ЦБ демонстрирует отсутствие активности каналов; б, д — регистрация токов через натриевые каналы после добавления ЦБ в раствор с цитоплазматической стороны мембраны; справа указаны значения мембранного потенциала; в, е — вольт-амперные характеристики каналов, активируемых ЦБ.

(2.5 или 5.0 мМ) было показано, что приложении цитохалазина к цитоплазматической стороне мембраны также приводит к активации натриевых каналов. На рис. 2, з—е представлены типичные записи натриевых токов в изолированном фрагменте мембраны до и после подачи цитохалазина Б (10 мкг/мл). Возрастание активности происходило в среднем через 2—3 мин после добавления цитохалазина во внутриклеточный раствор. Инактивации токов не наблюдали в течение всего времени регистрации. Подобный эффект активации натриевых каналов наблюдали в 7 опытах из 53 (13 %). Среднее значение проводимости одиночного канала составляло 11.6 ± 0.1 пСм. Как видно из анализа записей токов и вольт-амперных характеристик (рис. 2), проводящие свойства каналов близки к описанным ранее для натрий-селективных каналов в клетках K562 (Ведерникова и др., 1997; Negulyaev et al., 2000). Таким образом, как показали опыты на инвертированных мембранных фрагментах, эффект активации натриевых каналов при действии цитохалазина сохранялся после снижения содержания холестерина.

Возникает вопрос, имеет ли место активирующее действие цитохалазина на целые клетки после экстракции холестерина, а не на мембранные фрагменты? Для проверки этого в серии экспериментов регистрировали токи в участке мембраны неповрежденных клеток (cell-attached) в контроле, после инкубации с МБЦД (5 мМ, 1 ч) и последующей инкубации с цитохалазином (10 мкг/мл, 10 мин). При анализе достаточно большого объема данных мы не обнаружили какого-либо повышения активности натриевых каналов после действия цитохалазина на клетки с пониженным содержанием холестерина. Однако надо отметить, что в этих сериях опытов активность каналов была крайне низкой, как в контроле, так и в эксперименте. Таким образом, полученные данные не позволяют однозначно ответить на вопрос о том, влияет ли разборка актинового цитоскелета на характеристики каналов в нативных клетках после экстракции холестерина. Поэтому далее мы проверили действие деструкторов F-актина в другом варианте опыта: клетки не инкубировали предварительно с цитохалазином, а подавали его в экспериментальную ка-

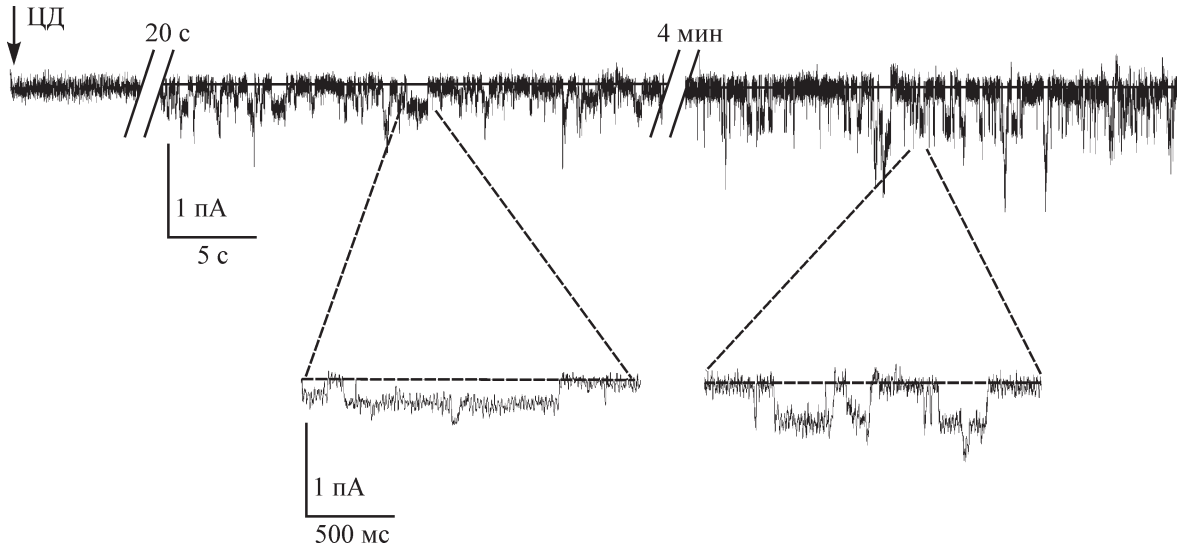


Рис. 3. Развитие во времени активации каналов в ответ на разборку актинового цитоскелета.

Регистрация тока в участке мембраны (cell-attached) при потенциале -20 мВ после обработки клеток 5 мМ МБЦД; стрелкой показан момент подачи 20 мкг/мл цитохалазина Д (ЦД). В нижней части рисунка показаны записи токов в развернутой временной шкале.

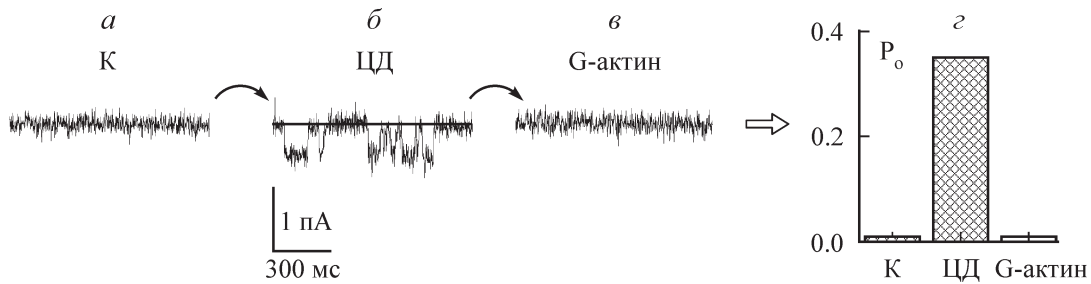


Рис. 4. Инактивация натриевых токов, индуцированная ЦД при добавлении G-актина. Эксперимент inside-out на клетках с пониженным содержанием холестерина.

Регистрация токов: а — в контроле (К); б — после подачи ЦД; в — после добавления G-актина (300 мкг/мл) в раствор с цитоплазматической стороны мембранного фрагмента; поддерживаемый потенциал -30 мВ; з — соответствующие значения вероятности открытого состояния каналов (P_o).

меру после формирования гигаомного контакта. С использованием варианта cell-attached регистрировали токи через одиночные каналы в участке мембраны нативной клетки. После инкубации клеток с МБЦД (5 мМ, 1 ч) в ответ на подачу цитохалазина (20 мкг/мл) во внеклеточный раствор наблюдали четкую активацию натриевых каналов (рис. 3). Развитие эффекта было несколько замедлено

по сравнению с типичной кинетикой для нормальных клеток.

Суммируя результаты, полученные на целых клетках и мембранных фрагментах, можно заключить, что при пониженном содержании холестерина в клетках K562 сохраняется основной механизм активации натриевых каналов после разборки кортикального актинового цитоскеле-

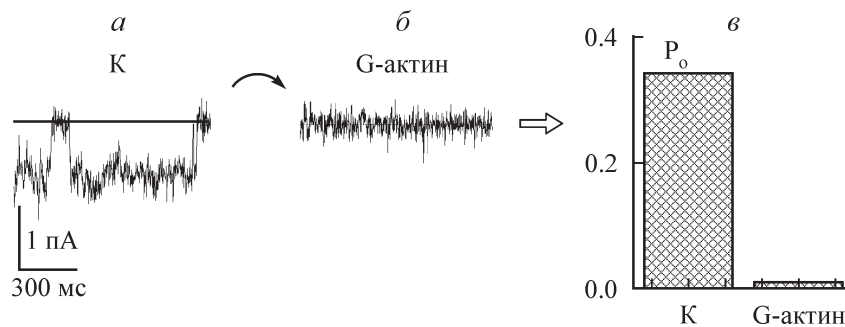


Рис. 5. Подавление спонтанной активности натриевых каналов в клетках, модифицированных МБЦД при подаче G-актина.

Записи токов в эксперименте inside-out при потенциале -30 мВ: а — в контроле (К); б — после добавления G-актина (300 мкг/мл) в растворе с цитоплазматической стороны мембранного фрагмента; в — значения вероятности открытого состояния каналов (P_o).

та. Для понимания природы активирующего действия деструкторов актина представляет интерес анализ развития эффекта на уровне одиночных открываний каналов. Как видно на рис. 3, в процессе активации первоначально наблюдаются токи, соответствующие каналам меньшей проводимости, а через 4—6 мин уже регистрируется активность каналов со стабильным уровнем проводимости 12 пСм. Регистрация в реальном масштабе времени позволяет исключить предположение о разных типах каналов.

Ранее было показано, что сборка филаментов на цитоплазматической стороне мембраны приводит к быстрой (в течение 2—3 мин) инактивации натриевых каналов в клетках K562 (Negulyaev et al., 2000; Shumilina et al., 2003). Мы проверили влияние глобулярного (G) актина на активность натриевых каналов, вызванную действием цитохалазина в клетках с пониженным содержанием холестерина. При добавлении в экспериментальную камеру G-актина, который, как известно, полимеризуется при повышении ионной силы раствора, наблюдали снижение активности каналов и соответственно вероятности открытого состояния (P_o) до нулевого значения (рис. 4). Процесс инактивации, по-видимому обусловленный сборкой филаментов на цитоплазматической стороне мембраны, развивался в течение 5—6 мин. Рис. 5 демонстрирует, что G-актин ингибировал не только индуцированную цитохалазином, но также и спонтанную активность натриевых каналов в клетках K562. Таким образом, в модифицированных по липидному составу клетках мы наблюдали подавление активности натриевых каналов при полимеризации актина. Возможно, имели место небольшие различия в кинетике инактивации по сравнению с контролем. Для корректного сравнения скорости инактивации необходимы серии экспериментов с параллельным тестированием одного препарата актина.

Обсуждение

Наши эксперименты были направлены на выявление возможной роли мембранных липидов и структуры бислоя в регуляции потенциалнезависимых натриевых каналов в клетках лейкемии человека K562. Функционирование каналов анализировали после частичной экстракции холестерина с использованием циклического олигосахарида МБЦД, избирательно связывающего стеролы в стехиометрическом соотношении 2 : 1 (Christian et al., 1997; Zidovetzki, Levitan, 2007). За последнее десятилетие применение циклодекстринов стало уже достаточно рутинным экспериментальным подходом. Эффективность экстракции холестерина с помощью МБЦД была подтверждена для клеток различных типов (Zidovetzki, Levitan, 2007). Методика апробирована и для клеток K562 (Mannechez et al., 2005; Morachevskaya et al., 2007). Предполагается, что такая обработка приводит к нарушению целостности богатых холестерином мембранных микродоменов (рафтов) (Zidovetzki, Levitan, 2007). Надо отметить, что концепция липидных рафтов базируется на биохимических данных по экстракции мембранных белков и физико-химических исследованиях модельных мембран (Brown, London, 2000; Xu, London, 2000; Brown, 2006). Однако некоторые авторы высказывают сомнения относительно существования и динамики рафтов в нативных клетках (Munro, 2003). Визуализация рафтов в клеточных мембранах остается проблематичной, несмотря на интенсивный

поиск экспериментальных подходов (Edidin, 2003; Gaus et al., 2003; Henderson et al., 2005). Таким образом, в настоящее время наиболее результативным остается функциональный подход, использованный и в наших электрофизиологических экспериментах, — изучение работы клеточных систем в условиях экстракции холестерина и предполагаемой деструкции рафтов.

В данной работе с использованием двух основных вариантов метода патч-кламп регистрировали электрическую активность в участке мембраны нативной клетки и в изолированном мембранном фрагменте. Во всех случаях унитарные токи измеряли в присутствии натрия как основного проникающего катиона в растворе с внеклеточной стороны мембраны. В параллельных сериях опытов проведено сопоставление свойств каналов в клетках K562 в контрольных условиях, после инкубации с акцептором стеролов МБЦД или деструктором F-актина цитохалазином Б или Д. При этом биофизические характеристики натриевых каналов, уровень их активности и частота встречаемости в клетках с пониженным уровнем холестерина были оценены впервые. Результаты показывают, что снижение уровня мембранного холестерина не оказывает существенного влияния на характеристики натриевых каналов как в случае спонтанной активности, так и после активации, вызванной разборкой кортикального цитоскелета. Проводимость каналов во всех сериях опытов составляла около 11—12 пСм, что является одним из характеристических признаков исследуемых каналов (Ведерникова и др., 1997; Negulyaev et al., 2000). Потенциалнезависимые натриевые каналы в клетках K562, A431, U937 и макрофагах близки по биофизическим характеристикам к эпителиальным натриевым каналам семейства ENaC (Ведерникова и др., 1999; Kleymann et al., 1999). Появилось несколько работ, посвященных исследованию функциональных и структурных связей эпителиальных натриевых каналов (ENaC) с липидными доменами (Hawwell et al., 2002; Hill et al., 2002; Shlyonsky et al., 2003). Их основные вопросы — влияние экстракции холестерина и возможная ассоциация субъединиц ENaC с липидными рафтами. Полученные авторами результаты весьма противоречивы; возможно, это обусловлено особенностями экспериментальных моделей, спецификой работы с каналами ENaC, экспрессированными при инъекции мРНК в ооциты или при трансфекции. В работе на культивируемых клетках А6 сообщается о снижении вероятности открытого состояния натриевых каналов апикальной мембраны после обработки МБЦД (Balut et al., 2006). Судя по нашим данным, эндогенные натриевые каналы в клетках K562 не ассоциированы с мембранными микродоменами, богатыми холестерином.

Как следует из наших экспериментов с цитохалазином и G-актином, в клетках K562 с пониженным содержанием холестерина сохраняется основной механизм регуляции натриевых каналов, непосредственно связанный с динамикой кортикального актина. Активацию каналов наблюдали при действии цитохалазина, причем как при внеклеточном приложении, так и с цитоплазматической стороны изолированного фрагмента клеточной мембраны. Поскольку метод патч-кламп позволяет регистрировать активность каналов и ее изменения в реальном масштабе времени, которое ограничено сохранением стабильности гигаомного контакта, мы использовали сравнительно высокие концентрации цитохалазина (10—20 мкг/мл). В модифицированных МБЦД клетках (но не во фрагментах мембран) развитие активации было более

продолжительным по сравнению с контролем: открывания каналов с типичной проводимостью (11—12 пСм) наблюдали через 4—8 мин. В экспериментах на мембранных фрагментах наблюдали подавление активности каналов при добавлении G-актина в раствор физиологической ионной силы (140 mM KCl), содержащий 2 mM Mg²⁺, который способствует быстрой полимеризации. Полученные результаты демонстрируют, что в условиях экстракции холестерина имеет место активация и инактивация каналов, обусловленные разборкой и сборкой примембранных филаментов, прочно ассоциированных с внутриклеточной стороной мембраны. Судя по имеющимся данным, ассоциация мембраны с филаментами, динамика которых сопряжена с регуляцией каналов, сохраняется после отделения фрагмента мембраны от клетки, а также в условиях деструкции липидных рафтов. Во-первых, это означает, что микрофиламенты могут быть связаны с мембраной не только в зоне липидных рафтов. Во-вторых, можно полагать, что именно интегральные белки (например, ионные каналы), не входящие в структуру рафтов, наиболее прочно связаны с белками цитоскелета.

Согласно современным представлениям, богатые холестерином и сфинголипидами микродомены играют важную роль во взаимосвязях плазматической мембраны и кортикального цитоскелета. Предполагалось, что эти участки служат так называемыми фокальными точками (focal points) для прикрепления микрофиламентов к цитоплазматической поверхности мембраны (Nebl et al., 2002). Обоснованием служили, в частности, данные о том, что экстракция холестерина и предполагаемая деструкция рафтов приводят к структурному разобщению белков цитоскелета и мембраны (Harder, Simons, 1999). Эта распространенная точка зрения рассматривалась нами в качестве рабочей гипотезы на начальном этапе исследований. Однако, как показали проведенные эксперименты, реальная картина не соответствует столь упрощенной трактовке. Анализ литературы и собственных результатов позволяет полагать, что экстракция холестерина действительно инициирует перестройки актиновой сети, но их характер может быть различным. В нашей предшествующей работе было обнаружено подавление активности механочувствительных катионных каналов в клетках K562 при снижении содержания мембранного холестерина (Morachevskaia et al., 2007). Данные флуоресцентной микроскопии подтверждают предположение о том, что эффект обусловлен реорганизацией F-актина, включающей в себя сборку филаментов, причем не только в кортикальной области. С этим предположением согласуются также наши наблюдения относительно вероятного ингибирования активирующего действия цитохалазина на натриевые каналы в клетках с пониженным уровнем холестерина. Что касается примембранного цитоскелета, то, судя по электрофизиологическим данным для модифицированных клеток, процессы реорганизации актина преимущественно локализованы в зоне рафтов и в значительно меньшей степени затрагивают межрафтовые участки, включающие в себя натриевые каналы.

При объяснении механизмов, обеспечивающих связь актинового цитоскелета с плазматической мембраной в клетках крови, как правило, предполагается участие линкерных белков семейства ERM (Denker, Barber, 2002). Менее известны потенциальные участники среди интегральных мембранных белков, особенно в суспензионных клетках. Как уже отмечалось, первоначально эта функция приписывалась богатому холестерину липидным микро-

доменам и входящим в их состав белкам (Nebl et al., 2002). Придерживаясь данной точки зрения, следовало бы ожидать, что при нарушении целостности рафтов нарушается и сопряжение мембранных белков с примембранным актином. Наши данные, напротив, демонстрируют функциональную связь актиновых элементов цитоскелета с ионными каналами, сохраняющуюся при нарушении целостности рафтов. Полученные в работе результаты позволяют полагать, что белки, формирующие натрийпроводящие каналы в клетках K562, могут быть компонентами заякоривающих структур актинового цитоскелета. Подобная гипотеза была предложена для Na/H-обменника (Denker et al., 2000). Таким образом, нельзя исключить, что основная функция этих белков связана с организацией и динамикой актинового цитоскелета в нативных клетках, а ионофорные свойства являются вторичными или сопутствующими.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00574) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Список литературы

- Ведерникова Е. А., Максимов А. В., Негуляев Ю. А. 1997. Функциональные свойства и цитоскелетзависимая регуляция натриевых каналов в плазматической мембране лейкозных клеток. Цитология. 39 (12) : 1142—1151.
- Ведерникова Е. А., Максимов А. В., Негуляев Ю. А. 1999. Функциональная характеристика и молекулярная топология потенциалнезависимых натриевых каналов. Цитология. 41 (8) : 658—666.
- Balut C., Steels P., Radu M., Ameloot M., Van Driessche W., Jans D. 2006. Membrane cholesterol extraction decreases Na⁺ transport in A6 renal epithelia. Amer. J. Physiol. Cell. Physiol. 290 : C87—C94.
- Brown D. A. 2006. Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. Amer. J. Physiol. 21 : 430—439.
- Brown D. A., London E. 2000. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. J. Biol. Chem. 275 : 17 221—17 224.
- Christian A. E., Haynes M. P., Phillips M. C., Rothblat G. H. 1997. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. J. Lipid Res. 38 : 2264—2272.
- Corey D. P., Garcia-Anoveros J. 1996. Mechanosensation and the DEG/ENaC ion channels. Science. 273 : 323—324.
- Denker S. P., Barber D. L. 2002. Ion transport proteins anchor and regulate the cytoskeleton. Curr. Opin. Cell Biol. 14 : 214—220.
- Denker S. P., Huang D. C., Orłowski J., Furthmayr H., Barber D. L. 2000. Direct binding of the Na-H exchanger NHE1 to ERM proteins regulates the cortical cytoskeleton and cell shape independently of H⁺ translocation. Mol. Cell. 6 : 1425—1436.
- Edidin M. 2003. The state of lipid rafts: from model membranes to cells. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 32 : 257—283.
- Gaus K., Gratton E., Kable E.P., Jones A.S., Gelissen I., Kritzarides L., Jessup W. 2003. Visualizing lipid structure and raft domains in living cells with two-photon microscopy. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 100 : 15 554—15 559.
- Hanill O. P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F. J. 1981. Improved patch-clamp technique for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pfluegers Arch. 391 : 85—100.
- Hanwell D., Ishikawa T., Saleki R., Rotin D. 2002. Trafficking and cell surface stability of the epithelial Na⁺ channel expressed in epithelial Madin-Darby canine kidney cells. J. Biol. Chem. 277 : 9772—9779.
- Harder T., Simons K. 1999. Clusters of glycolipid and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in lymphoid cells: accu-

mulation of actin regulated by local tyrosine phosphorylation. *Eur. J. Immunol.* 29 : 556—562.

Henderson R. M., Edwardson J. M., Geisse N. A., Saslowky D. E. 2005. Lipid rafts: feeling is believing. *News Physiol. Sci.* 19 : 39—43.

Hill W. G., An B., Johnson J. P. 2002. Endogenously expressed epithelial sodium channel is present in lipid rafts in A6 cells. *J. Biol. Chem.* 277 : 33 541—33 544.

Hille B. 2001. Ionic channels of excitable membranes. Sinauer Associates: Sunderland, MA, USA. 814 p.

Kleyman T. R., Sheng S., Kosari F., Kieber-Emmons T. 1999. Mechanism of action of amiloride: a molecular prospective. *Semin. Nephrol.* 19 : 524—532.

Levitan I., Christian A. E., Tulenko T. N., Rothblat G. H. 2000. Membrane cholesterol content modulates activation of volume-regulated anion current (VRAC) in bovine endothelial cells. *J. Gen. Physiol.* 115 : 405—416.

Mannechez A., Reungpatthanaphong P., de Certaines J. D., Leray G., Le Moyec L. 2005. Proton NMR visible mobile lipid signals in sensitive and multidrug-resistant K562 cells are modulated by rafts. *Cancer Cell Int.* 5 : 2 doi : 10.1186/1475-2867-5-2.

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

Munro S. 2003. Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell.* 115 : 377—388.

Nebl T., Pestonjamas K. N., Leszyk J. D., Crowley J. L., Oh S. W., Luna E. J. 2002. Proteomic analysis of a detergent-resistant membrane skeleton from neutrophil plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 277 : 43 399—43 409.

Negulyaev Y. A., Khaitlina S. Y., Hinssen H., Shumilina E. V., Vedernikova E. A. 2000. Sodium channel activity in leukemia cells is directly controlled by actin polymerization. *J. Biol. Chem.* 275 : 40 933—40 937.

Negulyaev Y. A., Maximov A. V., Vedernikova E. A., Katina I. E. 1997. Voltage-insensitive Na channels of different selectivity in human leukemic cells. *Gen. Physiol. Biophys.* 16 : 163—173.

Negulyaev Y. 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.

Shlyonsky V. G., Mies F., Saribian-Sohraby S. 2003. Epithelial sodium channel activity in detergent-resistant membrane microdomains. *Amer. J. Physiol. Renal Physiol.* 284 : F182—F188.

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

Spudich J. A., Watt S. 1971. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. 1. Biochemical studies of the interactions of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J. Biol. Chem.* 246 : 4866—4871.

Xu X., London E. 2000. The effect of sterol structure on membrane lipid domains reveals how cholesterol can induce lipid domain formation. *Biochemistry.* 39 : 843—849.

Zidovetzki R., Levitan I. 2007. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Rev. Biochim. biophys. acta.* 1768 : 1311—1324.

Поступила 2 IV 2009

FUNCTIONAL PROPERTIES OF SODIUM CHANNELS IN CHOLESTEROL-DEPLETED K562 CELLS

A. V. Sudarikova,¹ V. I. Chubinskij-Nadezhdin, Y. A. Negulyaev, E. A. Morachevskaya

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

¹ e-mail: nastya@mail.cytspb.rssi.ru

The level of cellular cholesterol is known to determine functional compartmentalization of membrane lipids into ordered microdomains (rafts). Lipid rafts are assumed to play an essential role in the interactions between cell membrane and cortical cytoskeleton. As we have shown earlier, the activity of non-voltage-gated sodium channels in K562 human leukaemia cells is critically dependent on actin cytoskeleton organization. In the present paper, functional properties of sodium channels in K562 cells were examined after cholesterol-depleting treatment using methyl-beta-cyclodextrin (MbCD), selective acceptor of sterols. Single currents through sodium channels were recorded in cell-attached and inside-out mode experiments with the use of patch clamp technique. After incubation with MbCD (2.5 or 5.0 mM), an activation of sodium channels in response to cytochalasin B or D was observed in membrane fragments as well as in native cells. Characteristics of the channels in cholesterol-depleted K562 cells were similar to those in control; unitary conductance was 12 pS. Inside-out experiments with the use of globular actin have indicated that filament assembly on cytoplasmic membrane side causes an inactivation of sodium channels. These data imply that there is no association of sodium channels with cholesterol-rich membrane microdomains in K562 cells. Possible mechanisms underlying an interplay between plasma membrane and cortical cytoskeleton are discussed.

Key words: plasma membrane, sodium channels, cytoskeleton, actin, cholesterol, human leukaemia cells, cytochalasin, methyl-beta-cyclodextrin.