

## СБОРКА АКТИНОВЫХ ФИЛАМЕНТОВ В ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ ПРИ ДЕЙСТВИИ МЕМБРАННЫХ МОДИФИКАТОРОВ, СВЯЗЫВАЮЩИХ ХОЛЕСТЕРИН

© Т. Н. Ефремова, В. И. Чубинский-Надеждин,<sup>1</sup> С. Ю. Хайтлина, Е. А. Морачевская

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;*

<sup>1</sup> электронный адрес: *vchubinskiy@gmail.com*

Работа направлена на выявление роли холестерина, одного из основных липидных компонентов плазматических мембран клеток млекопитающих, в организации и динамике актинового цитоскелета. Исследования выполнены на культивируемых трансформированных клетках (линии НЕК293, HEp2 и 3T3-SV40), характеризующихся слабым развитием стресс-фибрилл и сети микрофиламентов. Используя окрашивание F-актина родамин-фаллоидином, анализировали перестройки актинового цитоскелета после действия агентов, избирательно связывающих стеролы, — циклического олигосахарида метил-бета-циклодекстрина (МБЦД) и филипина, антибиотика группы макролидов. После обработки МБЦД или филипином в клетках всех исследованных линий выявлены сходные процессы реорганизации актиновых элементов цитоскелета, включающие в себя сборку филаментов. В клетках карциномы HEp2 и фибробластах 3T3-SV40 отмечены интенсивное формирование стресс-фибрилл и увеличение степени распластывания после действия реагентов, связывающих холестерин, т. е. наблюдались признаки реверсии трансформированного фенотипа. Реорганизация цитоскелета, вероятно, инициирована нарушением структуры липидных микродоменов, целостность которых критически зависит от мембранного холестерина.

Ключевые слова: плазматическая мембрана, актиновый цитоскелет, холестерин, липидные микродомены, метил-бета-циклодекстрин, филипин.

Присутствие стеролов является характерной особенностью мембран клеток эукариот. Холестерин (холестерол) — это один из основных липидных компонентов плазматической мембраны клеток млекопитающих. Известно, что динамические параметры липидного бислоя зависят от состава и концентрации стеролов (Ивков, Берестовский, 1982; Needham, Nunn, 1990). Поэтому присутствие стеролов в клеточных мембранах связывали прежде всего с механическими свойствами. Однако за последние десятилетия возникло новое понимание роли мембранных липидов, в частности стеролов, в жизнедеятельности клеток, сформировались новые концепции и гипотезы относительно организации клеточных мембран. Согласно современным представлениям, принципиальной особенностью их структурно-функциональной организации является латеральная гетерогенность бислоя, зависящая в первую очередь от липидного состава. Уровень мембранного холестерина имеет определяющее значение для структуры и целостности липидных микродоменов (рафтов, кавеол), участков, характеризующихся более плотной упаковкой, повышенным содержанием холестерина, сфинголипидов и насыщенных жирнокислотных остатков (Brown, London, 2000; Pike, 2009; Lingwood, Simons, 2010).

Участие липидных рафтов в различных процессах клеточной регуляции и передачи сигнала является предметом интенсивных исследований. Полагают, что снижение содержания мембранного холестерина приводит к деструкции липидных микродоменов и нарушению функционирования сигнальных каскадов, ассоциированных с рафтами. В связи с этим широкое распространение полу-

чили экспериментальные подходы с использованием акцепторов стеролов бета-циклодекстринов для выяснения степени участия мембранного холестерина и рафтов в различных процессах клеточной регуляции и передачи сигнала (Zidovetzki, Levitan, 2007).

Высказываются многочисленные гипотезы о роли холестерина и рафтов в передаче сигнала с поверхности мембраны к внутриклеточным структурам, в частности в процессах реорганизации и динамики актинового цитоскелета. Протеомный анализ выявил включение в состав рафтов различных актин-связывающих белков (Nebl et al., 2002). Первоначально рафты рассматривались как некие «фокальные точки», обеспечивающие связь мембраны с кортикальными микрофиламентами (Harder, Simons, 1999; Brown, London, 2000; Nebl et al., 2002). При этом предполагалось, что деструкция рафтов при частичной экстракции холестерина (cholesterol depletion) приводит к разобщению плазматической мембраны и цитоскелета и сопровождается повышением ее деформируемости. Однако как показали дальнейшие исследования, в том числе анализ изменений механических свойств комплекса «мембрана—цитоскелет» при варьировании уровня стеролов (Kwik et al., 2003; Byfield et al., 2004; Morachevskaya et al., 2007), такая точка зрения является весьма упрощенной. Нарушения структуры липидных рафтов, по-видимому, могут инициировать различные процессы реорганизации цитоскелета, включая полимеризацию примембранного актина (Qi et al., 2009).

Результаты исследований механочувствительных каналов в клетках лейкемии человека K562 и комплексов

тарные данные флуоресцентной микроскопии позволяют полагать, что экстракция холестерина метил-бета-циклодекстрином (МБЦД) приводит к сборке филаментов на базе имеющегося пула глобулярного актина (Morachevskaya et al., 2007). В электрофизиологических экспериментах с использованием цитохалазина и латрункулина показано, что изменения параметров активации каналов, наблюдаемые в клетках с пониженным содержанием холестерина, обусловлены именно реорганизацией цитоскелета (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2011).

Очевидно, однако, что возможности выявления перестроек актиновых структур в клетках миелоидного и лимфоидного ряда (K562 и многих других, по происхождению относящихся к клеткам крови) весьма ограничены. Поэтому и было предпринято настоящее исследование, в котором использовали более подходящие экспериментальные модели, чтобы выяснить, как влияет связывание (или экстракция) мембранного холестерина на актиновый цитоскелет. Были выбраны клеточные линии различного происхождения, характеризующиеся слабым развитием (3T3-SV40, HEp2) или отсутствием (НЕК293) стресс-фибрилл, что, вообще говоря, присуще трансформированным клеткам (Ровенский, Васильев, 2004). Их общим свойством можно считать сравнительно низкий уровень фибриллярного актина; иными словами, равновесие между фибриллярным и глобулярным актином смещено в сторону глобулярной формы (Pawlak, Helfman, 2001; Rao, Li, 2004). Эти известные особенности цитоскелета трансформированных клеток способствуют выявлению предполагаемой сборки филаментов. Задачи работы связаны с проверкой выдвинутой нами ранее гипотезы (Ефремова и др., 2009), согласно которой изменения актинового цитоскелета, иницированные деструкцией микродоменов, определяются в первую очередь соотношением глобулярного и фибриллярного актина в клетке.

## Материал и методика

Клетки. Объектами исследования были трансформированные фибробласты мыши 3T3-SV40, клетки эпидермоидной карциномы гортани HEp2 и эмбриональные клетки почки человека НЕК293. Клеточные линии получены из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки до образования монослоя. Для модификации липидного бислоя клетки инкубировали с МБЦД или филипином в среде (DMEM) без добавления сыворотки при 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub>. Реагенты получены от фирмы Sigma-Aldrich (США). Филипин предварительно растворяли в диметилсульфоксиде, МБЦД растворяли непосредственно в среде. Контролем служили клетки, обработанные аналогичным образом без добавления вещества, связывающего холестерин.

Флуоресцентная микроскопия. Для визуализации актиновых структур применяли стандартные методики фиксации и окраски с использованием родамин-фаллоидина (TRITC-Phalloidin; Sigma-Aldrich, США). Покровные стекла с клетками отмывали от среды фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), фиксировали 3.7%-ным раствором параформальдегида в течение 10 мин при комнатной температуре, пермеабелизовывали 0.1%-ным раствором Тритона X-100 в течение 10 мин при комнатной температуре и окрашивали родамин-фаллоидином

в течение 15 мин при 37 °С. После процедур фиксации и пермеабелизации клетки отмывали PBS трижды по 3 мин.

Для получения изображений использовали флуоресцентный микроскоп Carl Zeiss Axioscope или Carl Zeiss IM 35, возбуждая и регистрируя флуоресценцию при длинах волн 546 и 590 нм соответственно. Использовали объективы 100×1.3. Обработку изображений производили с использованием программных пакетов GIMP и ImageJ.

## Результаты

Для выяснения роли мембранного холестерина в организации цитоскелета исследовали изменения F-актина после действия циклического олигосахаридов МБЦД и филипина, антибиотика группы макролидов. Общим свойством двух этих агентов, имеющих разную химическую природу, является избирательное связывание стеролов, в частности мембранного холестерина. Клетки обрабатывали хелаторами стеролов в среде культивирования без добавления сыворотки, поскольку она содержит значительное количество липопротеидов. Для частичной экстракции холестерина клетки инкубировали с 5 мМ МБЦД (37 °С, 5 % CO<sub>2</sub>) в течение 30, 60 или 120 мин. Контрольными являлись клетки, переведенные на среду без сыворотки без добавления МБЦД.

После действия МБЦД в клетках НЕК293 происходило повышение интенсивности флуоресценции родамин-фаллоидина, связанного с F-актином (рис. 1). Наблюдаемые эффекты близки к полученным ранее на клетках K562 (Morachevskaya et al., 2007; Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2011) и, как мы полагаем, отражают сборку филаментов при снижении содержания холестерина. В клетках НЕК293, как и в клетках K562, актиновый цитоскелет в контроле выявляется преимущественно в виде кортикального слоя. В цитоплазме клеток с пониженным содержанием холестерина формируется актиновая сеть микрофиламентов, расположенных хаотично. В итоге фибриллярные структуры и их перестройки выявляются недостаточно отчетливо. Поэтому далее были проведены опыты на трансформированных клетках различного происхождения, характеризующихся более развитой и структурированной системой микрофиламентов. Это, во-первых, трансформированные фибробласты мыши 3T3-SV40, а во-вторых — клетки эпидермоидной карциномы гортани человека HEp2.

В клетках 3T3-SV40 после инкубации с МБЦД обнаружены явные изменения актиновых структур и формы клеток (рис. 2). Образуются параллельные актиновые пучки (стресс-фибриллы), ориентированные вдоль длинной оси клетки. В контроле трансформированные фибробласты 3T3-SV40 имеют округлую форму и низкое содержание фибриллярного актина; в клетках отсутствуют выраженные стресс-фибриллы (рис. 2, а). После частичной экстракции холестерина фибробласты утрачивают эти характерные признаки трансформированного фенотипа. Таким образом, снижение уровня холестерина приводит к существенным изменениям морфологии клеток, связанным с реорганизацией актинового цитоскелета (рис. 2, б, в).

Следует отметить, что аналогичные изменения цитоскелета наблюдали при всех сроках инкубации трансформированных фибробластов с МБЦД (30, 60 или 120 мин). Увеличение времени обработки до 120 мин (рис. 2, в) со-

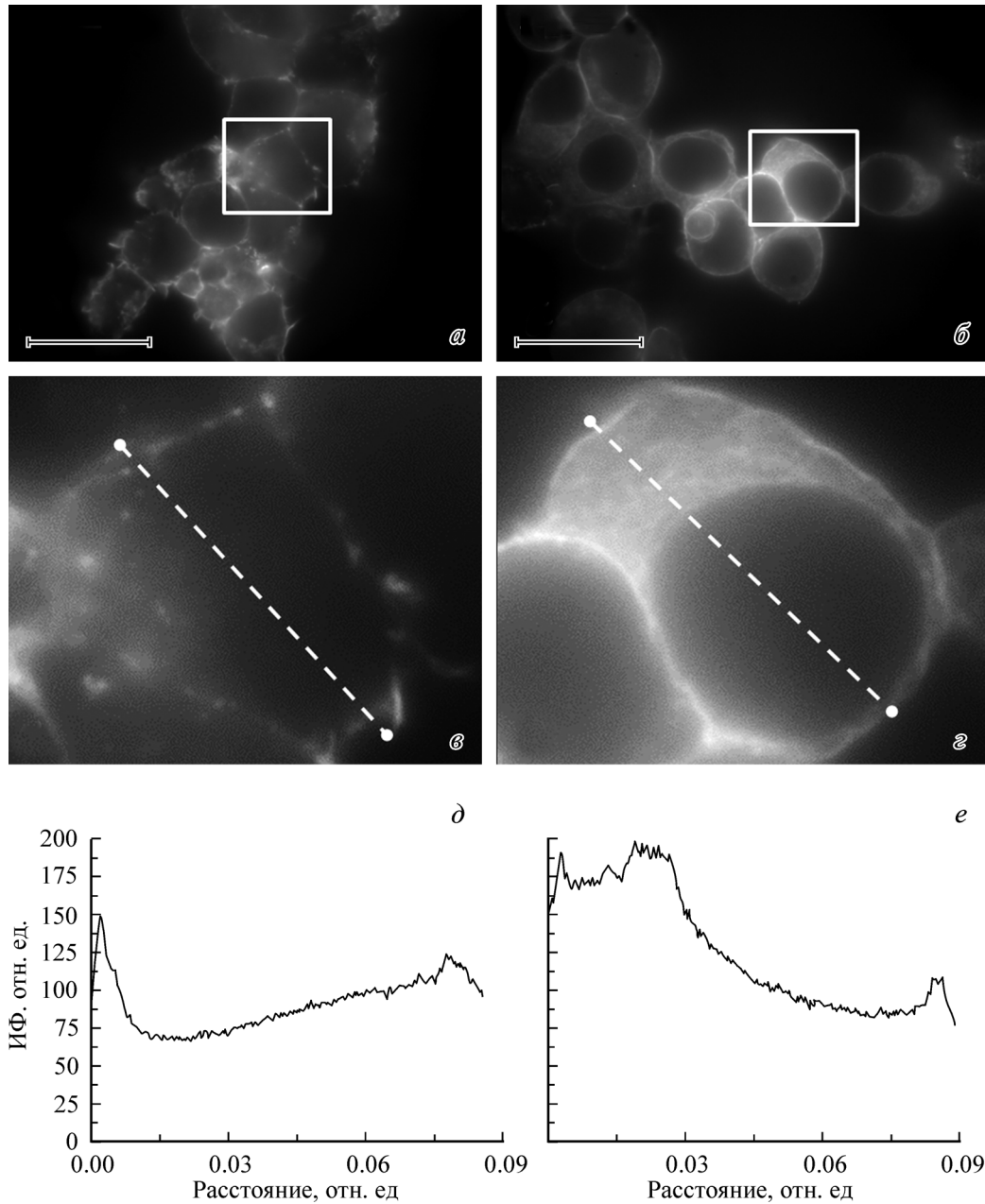


Рис. 1. Выявление F-актина в клетках HEK293 в контроле (а, в) и после 60-минутной инкубации с 5 мМ метил-бета-циклодекстрина (МБЦД; б, г).

в, г — увеличение участков полей, выделенных белыми прямоугольниками (на а и б); д, е — профили интенсивности флуоресценции (ИФ, отн. ед.), соответствующие штриховым линиям (на в и г). Масштабная линейка — 50 мкм.

проводилось нарушением монослоя, откреплением клеток, но не приводило к усилению специфического влияния на актиновые структуры. В то же время эффект МБЦД был необратим. Процессы реорганизации цитоскелета в клетках с пониженным содержанием холестерина развивались и после удаления реагента из среды (рис. 2, б).

Еще более выраженную реорганизацию актиновых элементов цитоскелета после действия МБЦД наблюдали в экспериментах на клетках эпидермоидной карциномы HEp2 (рис. 3). В контрольных препаратах актиновые структуры в клетках HEp2 выявляются преимущественно в виде нитей, расположенных хаотично; в кортикальной зоне выявляются короткие актиновые пучки (рис. 3, а, б).

После обработки МБЦД в течение 30 или 60 мин интенсивно формируются стресс-фибриллы, клетки становятся более распластанными. Последующая инкубация в среде после удаления реагента способствовала развитию процессов реорганизации цитоскелета после действия МБЦД (рис. 3, в—е). Обобщая полученные данные (рис. 1—3), можно заключить, что частичная экстракция холестерина при действии акцептора стеролов МБЦД приводит к полимеризации актина и сборке филаментов в трансформированных клетках.

Для выяснения механизмов, опосредующих влияние холестерина (или его экстракции) на актиновые структуры, исследовали действие филипина, мембранного модификатора, селективно связывающего холестерин, но не

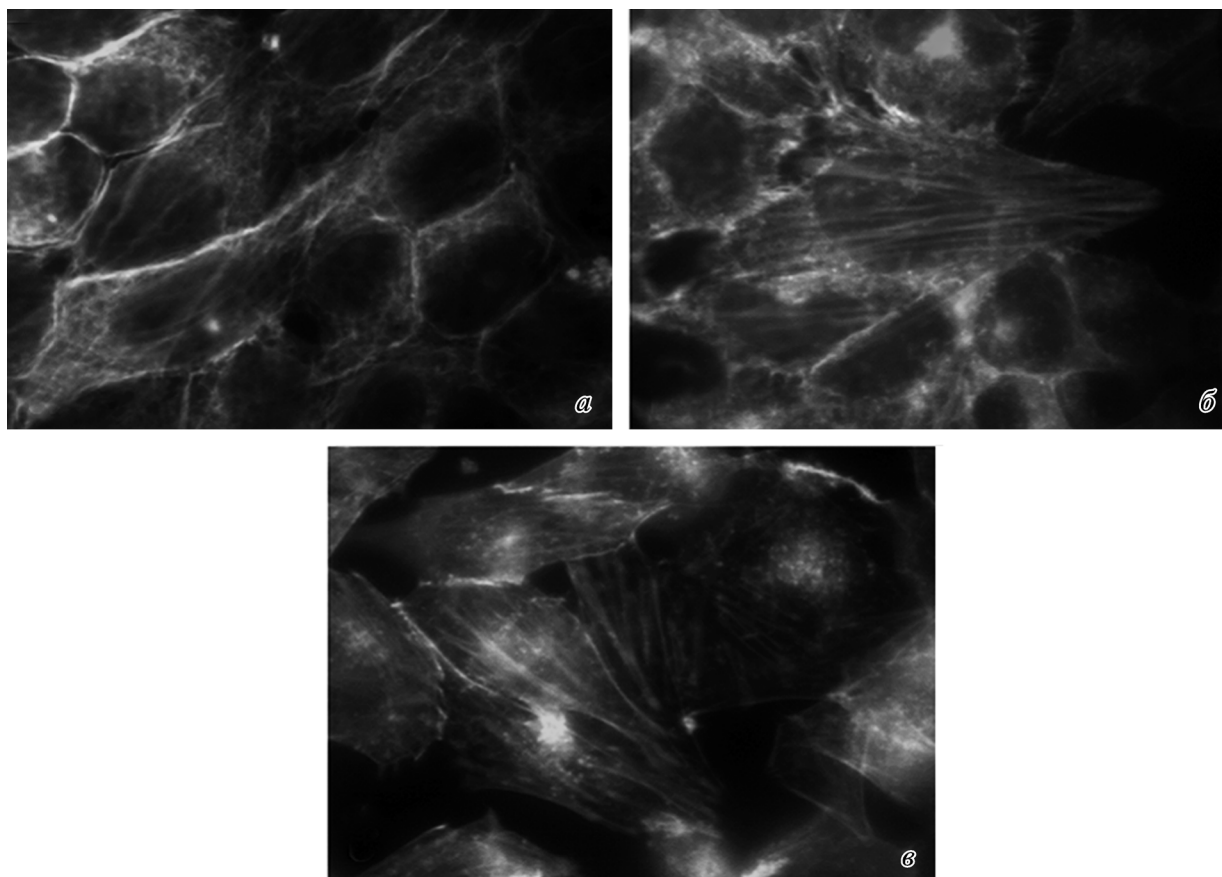


Рис. 2. Реорганизация актинового цитоскелета в клетках 3Т3-SV40 после действия 5 мМ МбЦД.  
а — контроль; б, в — после инкубации с МбЦД в течение 60 и 120 мин соответственно. Об. 100×.

приводящего к его экстракции в водную фазу (Arthur et al., 2011). Обработка филипином (5 или 10 мкг/мл) также приводила к реорганизации актиновых элементов цитоскелета (рис. 4). Перестройки микрофиламентов отмечены после кратковременной инкубации с филипином (5 или 10 мин) и были сходны с эффектами МбЦД, но развивались существенно быстрее. Так, в клетках Нер2 филипин вызывает сборку филаментов уже через 5 мин: образуются параллельные стресс-фибрилярные структуры, увеличивается площадь клеток за счет большей расплывчатости (рис. 4, б). Последующая 60-минутная инкубация (в среде без реагента) подтверждала необратимость эффекта (рис. 4, в). Продолжительная обработка филипином (до 60 мин) приводила к значительным повреждениям монослоя и массовой гибели клеток, т. е. проявлению его токсического действия (более выраженного по сравнению с МбЦД). Отметим также, что клетки карциномы Нер2 были более устойчивы к повреждающему действию реагентов по сравнению с трансформированными фибробластами 3Т3-SV40.

### Обсуждение

В нашей работе проведено сравнительное исследование реорганизации актинового цитоскелета при действии двух известных мембранных модификаторов, избирательно связывающихся с холестерином, — МбЦД и филипина. Эти вещества различны по физико-химическим

свойствам и механизму действия на липидный бислой. МбЦД получил широкую известность как «инструмент» для выяснения степени участия мембранного холестерина и рафтов в различных процессах клеточной регуляции и передачи сигнала (Zidovetzki, Levitan, 2007). Обработка клеток МбЦД считается наиболее эффективным методом изменения их стерольного состава. Инкубация клеток в присутствии бета-циклодекстринов в миллимолярных концентрациях обеспечивает частичную экстракцию холестерина вследствие его связывания и перехода в водную фазу в виде комплекса МбЦД—холестерин в соотношении 2 : 1 (Christian et al., 1997; Zidovetzki, Levitan, 2007). Предполагается, что снижение уровня мембранного холестерина приводит к деструкции липидных микродоменов (рафтов). Филипин обладает меньшей гидрофильностью и в отличие от циклодекстринов модифицирует структуру липидного бислойа вследствие связывания и образования комплекса с мембранным холестерином в пределах липидного бислойа. О нарушении целостности рафтов при действии филипина свидетельствуют, в частности, обнаруженные изменения кластеризации рафт-ассоциированных белков (Chichili, Rodgers, 2007). Сам факт необратимого связывания с плазматической мембраной подтверждают также данные флуоресцентных исследований, поскольку филипин является флуорофором и часто используется для мечения холестерина и клеточной поверхности (Arthur et al., 2011).

Как показано в наших опытах, МбЦД и филипин сходным образом влияли на актиновый цитоскелет

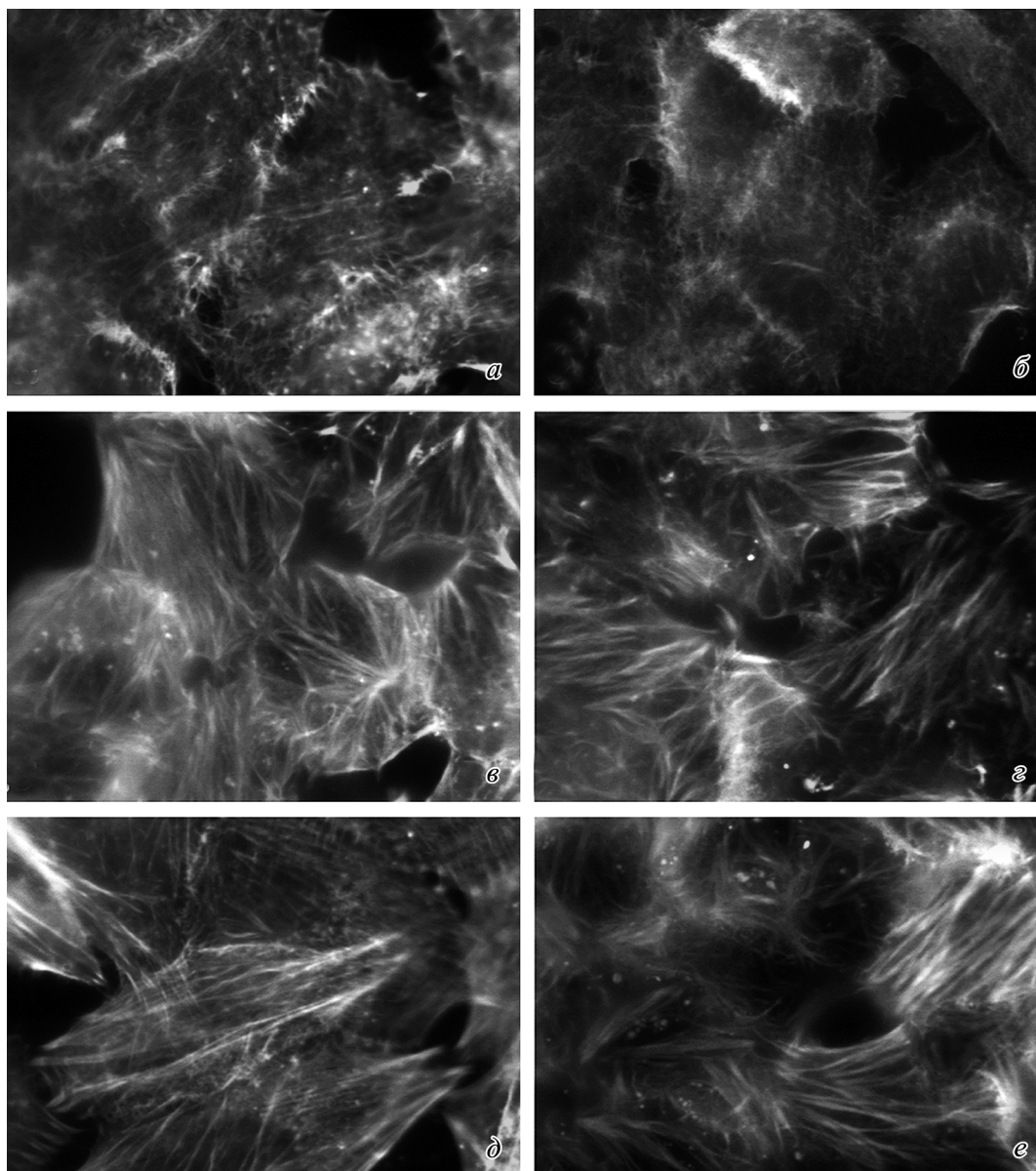


Рис. 3. Реорганизация актинового цитоскелета в клетках Hep2 после действия 5 мМ МБЦД. *a, б* — контроль; *в—е* — через 1 ч после инкубации с МБЦД в течение 30 (*в, з*) или 60 (*д, е*) мин. Об. 100×.

(рис. 3, 4). Обработка хелаторами стеролов приводила к увеличению количества фибриллярного актина и способствовала формированию стресс-фибрилл в трансформированных клетках. Полученные данные позволяют полагать, что нарушение структуры рафтов запускает процессы реорганизации цитоскелета, приводящие к сборке филаментов в клетках с высоким содержанием глобулярного актина. Морфологические изменения клеток и перестройки цитоскелета, наблюдаемые при действии реагентов, связывающих холестерин, были подобны тем изменениям, которые наблюдались после обработки антиоксидантами (Ефремова и др., 2004; Gamaley et al., 2006) и могли быть описаны как реверсия трансформированного фенотипа.

Полученные данные демонстрируют значение мембранного холестерина в организации и динамике актинового цитоскелета. Становится очевидным, что функциональная роль холестерина в составе клеточных мембран

не исчерпывается его влиянием на вязкоэластичные свойства липидного бислоя. Более того, даже участие холестерина в процессах механотрансдукции, по-видимому, опосредовано реорганизацией цитоскелета (Byfield et al., 2004; Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2011). В экспериментах на клетках HEK293, 3T3-SV40 и Hep2 после частичной экстракции холестерина наблюдали сходные изменения актиновой сети (рис. 1—3), аналогичные изменениям, выявленным ранее в клетках миелоидной лейкемии человека K562 (Morachevskaya et al., 2007; Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2011).

Результаты наших исследований согласуются с данными, полученными на культивируемых остеобластах MC3T3, клетках аденокарциномы РС3 и асцитных клетках, согласно которым снижение уровня мембранного холестерина инициирует полимеризацию актина и сборку филаментов (Klausen et al., 2006; Qi et al., 2009). Авторы сообщают о вероятном вовлечении Src-киназы, рафтас-

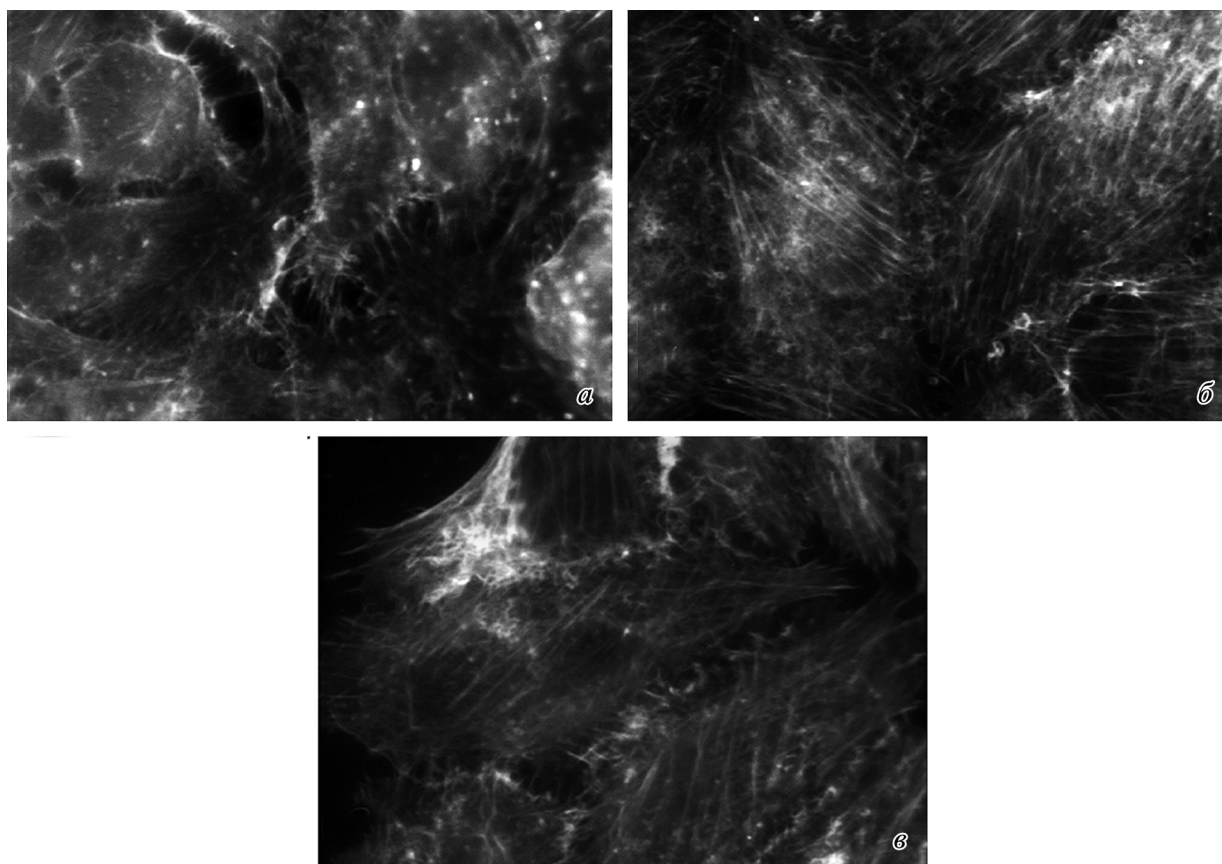


Рис. 4. Реорганизация актинового цитоскелета в клетках Her2 после обработки филипином (10 мкг/мл).

*a* — контроль; *b*, *в* — после 5-минутной инкубации с филипином (*b*) и через 60 мин после его удаления из среды (*в*). Об. 100×.

социированного белка, в активацию нескольких сигнальных путей, приводящих к формированию стресс-фибрилл после действия МБЦД (Qi et al., 2009). Однако в исследованиях на культивируемых фибробластах (Kwik et al., 2003) и клетках эндотелия линии ВАЕС (Byfield et al., 2004) не было выявлено полимеризации актина и сборки филаментов после экстракции холестерина; в фибробластах показана редукция стресс-фибрилл. Возможно, очевидные различия и даже разнонаправленность эффектов экстракции холестерина, обнаруженных разными авторами, обусловлены различной степенью развития актинового сети в клетках разных типов. Анализ данных литературы и результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что в клетках с низким содержанием фибриллярного актина нарушение целостности рафтов инициирует сигнальные процессы, приводящие к сборке микрофиламентов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований.

#### Список литературы

Ефремова Т. Н., Кирпичникова К. М., Хайтлина С. Ю., Гамалей И. А. 2004. Перестройки актинового цитоскелета в клетках 3Т3 и 3Т3SV40 в присутствии антиоксидантов. Цитология 46 (5) : 395—403.

Ефремова Т. Н., Чубинский-Надеждин В. И., Негуляев Ю. А., Хайтлина С. Ю., Морачевская Е. А. 2009. Влияние экстракции мембранного холестерина на характеристики меха-

ночувствительных каналов и актиновый цитоскелет. В кн.: Рецепция и внутриклеточная сигнализация. Пушкино. 42—45.

Итков В. Г., Берестовский Т. Н. 1982. Липидный бислой биологических мембран. М.: Наука. 224 с.

Ровенский Ю. А., Васильев Ю. М. 2004. Морфогенетические реакции клеток и их нарушения при опухолевой трансформации. В кн.: Канцерогенез. М.: Медицина. 376—414.

Arthur J. R., Heinecke K. A., Seyfried T. N. 2011. Filipin recognizes both GM1 and cholesterol in GM1 gangliosidosis mouse brain. J. Lipid Res. 52 (7) : 1345—1351.

Brown D. A., London E. 2000. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. J. Biol. Chem. 275 : 17221—17224.

Byfield F. J., Aranda-Espinoza H., Romanenko V. G., Rothblat G. H., Levitan I. 2004. Cholesterol depletion increases membrane stiffness of aortic endothelial cells. Biophys. J. 87 : 3336—3343.

Chichili G. R., Rodgers W. 2007. Clustering of membrane raft proteins by actin cytoskeleton. J. Biol. Chem. 282 : 36 682—36 691.

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.

Chubinskiy-Nadezhdin V. I., Negulyaev Y. A., Morachevskaya E. A. 2011. Cholesterol depletion-induced inhibition of stretch-activated channels is mediated via actin rearrangement. Biochem. Biophys. Res. Commun. 412 : 80—85.

Gamaley I., Efremova T., Kirpichnikova K., Kever L., Komisarschik Y., Polozov Y., Khaillina S. 2006. N-acetylcysteine-induced changes in susceptibility of transformed eukaryotic cells to bacterial invasion. Cell Biol. Int. 30 : 319—325.

Harder T., Simons K. 1999. Clusters of glycolipid and glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins in lymphoid cells: accu-

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

Klausen T. K., Hougaard C., Hoffmann E. K., Pedersen S. F. 2006. Cholesterol modulates the volume-regulated anion current in Ehrlich—Lettre ascites cells via effects on Rho and F-actin. *Amer. J. Physiol.* 291 : 757—771.

Kwik J., Boyle S., Fooksman D., Margolis L., Sheetz M. P., Edidin M. 2003. Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent organization of cell actin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 100 : 13 964—13 969.

Lingwood D., Simons K. 2010. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science.* 327 : 46—50.

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

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.

Needham D., Nunn R. S. 1990. Elastic deformation and failure of lipid bilayer membranes containing cholesterol. *Biophys. J.* 58 : 997—1009.

Pawlak G., Helfman D. M. 2001. Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. *Curr. Opin. Genet. Develop.* 11(1) : 41—7.

Pike L. J. 2009. The challenge of lipid rafts. *J. Lipid Res.* 50 : 323—328.

Qi M., Liu Y., Freeman M. R., Solomon K. R. 2009. Cholesterol-regulated stress fiber formation. *J. Cell. Biochem.* 106 : 1031—1040.

Rao J. Y., Li N. 2004. Microfilament actin remodeling as a potential target for cancer drug development. *Curr. Cancer Drug Targets.* 4 : 345—354.

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 18 I 2012

#### ASSEMBLY OF ACTIN FILAMENTS INDUCED BY SEQUESTRATION OF MEMBRANE CHOLESTEROL IN TRANSFORMED CELLS

T. N. Efremova, V. I. Chubinskiy-Nadezhdin,<sup>1</sup> S. Yu. Khaitlina, E. A. Morachevskaya

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

<sup>1</sup> e-mail: vchubinskiy@gmail.com

Cholesterol is one of the major lipid components of plasma membrane and it plays an important role in various signaling processes in mammalian cells. Our study focused on the role of membrane cholesterol in organization and dynamics of actin cytoskeleton. Experiments were performed on cultured transformed cells characterized by weakly developed actin network and reduced stress fibers — human embryonic kidney HEK293 cells, epidermoid larynx carcinoma HEP2 cells and mouse fibroblasts 3T3-SV40. Using F-actin labeling with rhodamine-phalloidin, actin cytoskeleton rearrangements were analyzed after sequestration of membrane cholesterol by cyclic oligosaccharide methyl-beta-cyclodextrin, and polyene macrolide antibiotic filipin. In cells treated with methyl-beta-cyclodextrin or filipin, similar processes of actin cytoskeleton reorganization involving filament assembly were revealed. In carcinoma HEP2 cells and fibroblasts 3T3-SV40, cholesterol-sequestering reagents induced intensive stress fiber formation and enhanced cell spreading which corresponded to reversion of transformed phenotype. The rearrangements of cytoskeleton are likely initiated by disruption of lipid raft integrity that is critically dependent on the level of the membrane cholesterol.

**Key words:** plasma membrane, actin cytoskeleton, cholesterol, lipid microdomains, human leukaemia, methyl-beta-cyclodextrin, filipin.