

РОЛЬ ХОЛЕСТЕРИНА В МЕМБРАННОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ TRPV5 В Т-КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ JURKAT

© 2020 г. Л. В. Кевер¹, С. Б. Семенова¹, *

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: svsem@incras.ru

Поступила в редакцию 10.10.2019 г.

После доработки 08.11.2019 г.

Принята к публикации 11.11.2019 г.

Многие ионные каналы локализуются в областях плазматической мембраны, обогащенных холестерином и сфинголипидами, известных как липидные рафты. Проблема взаимодействия ионных каналов с рафтами является одной из самых малоизученных в современной биологии и физиологии. В настоящей работе мы исследовали роль липидных рафтов в мембранной локализации кальциевых каналов TRPV5 (transient receptor potential vanilloid, type 5), обнаруженных нами ранее в Т-клетках человека линии Jurkat. Иммунофлуоресцентный анализ клеток показал примембранную локализацию белков TRPV5 и их колокализацию с липидными рафтами. Уменьшение мембранного холестерина с использованием метил-β-циклодекстрина (МБЦД) приводило к уменьшению поверхностной экспозиции каналов и их диффузному распределению в цитоплазме клеток. Анализ изображений клеток, полученный с помощью иммуноэлектронной микроскопии выявил локальные скопления белков TRPV5 в виде кластеров в плазматической мембране клеток. Экстракция мембранного холестерина и разрушение липидных рафтов приводили к исчезновению кластеров каналов и уходу каналов TRPV5 с плазматической мембраны клеток в цитоплазму. В целом полученные результаты показали, что локализация кальциевых каналов TRPV5 в виде кластеров в плазматической мембране критически зависит от уровня холестерина и целостности липидных рафтов в Т-клетках линии Jurkat.

Ключевые слова: кальциевые каналы TRPV5, холестерин, липидные рафты, иммуноэлектронная микроскопия, Т-клетки Jurkat

DOI: 10.31857/S0041377120030037

Кальций-проводящие каналы TRP представляют собой полимодальные ионные датчики, которые, реагируя на различные физические и химические раздражители, интегрируют множество сигналов, поступающих в клетку. Каналы TRP участвуют в подавляющем большинстве реакций организма, включая зрительную, обонятельную, болевую и температурную рецепции (Montell et al., 2002; Clapham, 2003; Flockerzi, 2007). Они задействованы в нейрогенезе, развитии мозга и синаптической трансмиссии (Vennekens et al., 2012). Ряд каналов TRP участвует в иммунитете и обменных процессах организма (Fernandes, 2012). Поэтому неудивительно, что дисфункции многих каналов суперсемейства TRP приводят к развитию различных заболеваний (Nilius, 2007).

Являясь интегральными белками, каналы TRP чувствительны к липидному составу мембраны, в которую они встроены. До недавних пор считалось, что липиды играют в клетке только пассивную роль, являясь простыми строительными блоками для мембран, разграничивая внутриклеточные компартменты и отделяя внутреннюю среду от внеклеточной среды клетки. Однако за последние десятилетия возникло новое понимание роли липидов в жизнедеятельности клеток. Стало известно, что основные липиды плазматической мембраны, такие, как холестерин и сфинголипиды могут плотно упаковываться вместе, образуя микродомены (липидные рафты), участвующие во многих функциональных реакциях клеток (Simons, Toomre, 2000; Pizzo, Viola, 2003). Известно участие рафтов в таких процессах, как транспорт мембранных белков, сборка сигнальных комплексов, передача нервных импульсов, эндо- и экзоцитоз, а также регуляция активности ионных каналов

Принятые сокращения: МБЦД – метил-β-циклодекстрин; FITC-СТВ – конъюгат β-субъединицы холерного токсина и флуоресцентного красителя FITC; TRPV5 – transient receptor potential vanilloid, type 5.

(Levitani et al., 2000; Lundbaek et al., 2003; Schengrund, 2010; Sheng et al., 2012).

Состав липидов в значительной степени определяет структурные и физические свойства плазматической мембраны, ее текучесть, кривизну и жесткость (Yeagle, 1985), что критически влияет на гейтинг ионных каналов (Pucadyil, Chattopadhyay, 2004). На свойства каналов также могут влиять ассоциированные с липидными рафтами различные сигнальные белки. Кроме того, некоторые липиды сами могут выступать в качестве специфических агонистов ионных каналов. Важные данные относительно регулирования функций канала холестерином были получены при использовании метил- β -циклодекстрина (МБЦД) (Heino et al., 2000; Slimane et al., 2001; Varbuti et al., 2004). Так, экстракция мембранного холестерина показала, что активность каналов TRPM8 критически зависит от целостности липидных рафтов, поскольку приводила к значительному сдвигу порога активации термо-чувствительных каналов TRPM8 в сторону более высоких температур (Morenilla-Palao et al., 2009). Таким же образом разрушение липидных рафтов путем истощения любого из главных его компонент фармакологическими инструментами блокировало агонист-зависимую активацию каналов TRPV1 (Szoke et al., 2010). Вход Ca^{2+} в клетки прекращался, либо когда холестерин был истощен с помощью МБЦД (Liu et al., 2006; Kilsdonk et al., 1995), либо когда молекулы сфингомиелина были разрушены сфингомиелиназой (Kobayashi et al., 2006).

Два члена суперсемейства TRP – каналы TRPV5 и TRPV6 (первоначально известные, как CaT2 и CaT1, или ECaC1 и ECaC2) были впервые клонированы из эпителиальных клеток почки кролика и тонкого кишечника крысы (Hoenderop et al., 2001; Peng, Hediger, 2002). Позднее они были отнесены к подсемейству ванилоидных рецепторов (TRPV) и идентифицированы в клетках других млекопитающих, включая человека (Nijenhuis et al., 2003). Показано, что эти каналы могут обеспечивать строго дозированное поступление Ca^{2+} и участвовать в активной (ре)абсорбции Ca^{2+} в эпителиальных клетках почек, тонком кишечнике и плаценте (Hoenderop, 2002; Nijenhuis et al., 2003). Ранее с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени и Вестерн-блот-анализа мы показали экспрессию каналов TRPV5 и TRPV6 в Т-клетках лейкомии человека линии Jurkat (Vasilieva et al., 2013).

Кальциевые каналы TRPV5 и TRPV6 являются конститутивно активными, поэтому избирательная ассоциация ионных каналов с конкретным липидным микроокружением в мембране может быть критически необходима для их активации. Несмотря на это, вопрос о взаимодействии кальциевых каналов TRPV5 с липидным микроокружением и липидными рафтами практически не изучен. Ранее с помощью электрофизиологических и иммунофлуоресцентных методов, а также метода иммуноэлектрон-

ной микроскопии мы показали, что мембранный холестерин регулирует активность каналов TRPV6 в Т-клетках человека линии Jurkat (Kever et al., 2019).

В настоящей работе мы изучали роль липидных рафтов в локализации кальциевых каналов TRPV5 в плазматической мембране Т-клеток лейкомии человека линии Jurkat.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки линии Jurkat получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки культивировали при 37°C в среде RPMI 1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 0.008% гентамицина при температуре 37°C в атмосфере 5% CO_2 .

Имунофлуоресцентный анализ проводили на клетках, которые предварительно были посеяны на стекла, покрытые поли-*L*-лизинном. Клетки инкубировали 40 мин (при 37°C и 5% CO_2) в среде без сыворотки в присутствии и отсутствие (контрольные клетки) 1% метил- β -циклодекстрина (МБЦД, Sigma-Aldrich). Далее клетки фиксировали в растворе 3.7%-ного параформальдегида и пермеабелизовали в присутствии 0.25%-ного Tween 20. Затем контрольные и обработанные клетки инкубировали сперва с первичными антителами (в разведении 1 : 100), выработанными против TRPV5 (H-99, Santa Cruz Biotechnology, США) в течение ночи (при 4°C), а потом с вторичными антикроличьими антителами (1 : 200), конъюгированными с Cy3 (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Великобритания) в течение 40 мин (при 37°C). Для визуализации липидных рафтов, богатых холестерином, использовали специфический маркер липидных рафтов, β -субъединицу холерного токсина (5 мг/мл), конъюгированную с FITC (FITC-CTB, Sigma-Aldrich). После окрашивания клеток FITC-CTB покровные стекла заключали в смолу Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, США) и исследовали с помощью конфокального микроскопа Olympus FV3000 (Olympus Corporation, Япония), используя масляный объектив 60 \times . Интенсивность флуоресценции (по меньшей мере 7–15 клеток) в каждом эксперименте оценивали с помощью программы ImageJ (НИН, США) и усредняли. Интенсивность флуоресценции в контрольных и обработанных клетках сравнивали с использованием стандартного *t*-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде среднего значения и его ошибки. Различия считали достоверными при $P < 0.05$.

Имуноэлектронная микроскопия. Контрольные и обработанные МБЦД клетки фиксировали в растворе PBS, содержащем 2% параформальдегида и 0.5% глутаральдегида в течение 1 ч, затем обезвоживали в

спиртах и заливали в акриловую смолу LR-White. Ультратонкие срезы помещали на никелевые сетки, покрытые формваровой пленкой. Для иммуноокрашивания срезы экспонировали 20 мин в 1%-ном BSA на PBS, а затем инкубировали в течение 1 ч сначала с первичными (в разведении 1 : 100) анти-TRPV5 антителами (H-99, Santa Cruz Biotechnology, США), потом с вторичными (1 : 50) антикроличьими антителами, конъюгированными с коллоидным золотом (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, США). В работе использовали коллоидное золото с размером частиц 10 нм. Срезы клеток, обработанные антителами, контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца и анализировали с помощью электронного микроскопа Libra-120 (Германия).

Подготовка препаратов мембранных фрагментов для иммуноэлектронной микроскопии. Использовали описанную процедуру (Sanan, Anderson, 1991). Покровные стекла с предварительно посеянными на них клетками быстро охлаждали путем погружения в ледяной буфер (25 мМ Hepes, 25 мМ KCl, 2.5 мМ Mg(CH₃COO)₂) и переворачивали на никелевые сетки с формваровой пленкой, предварительно покрытые поли-*L*-лизинном. С помощью резиновой пробки покровные стекла с клетками в течение 20 с прижимали к никелевым сеткам. Затем стекла резко отрывали от никелевых сеток, при этом на сетках оставались участки плазматической мембраны клеток. Никелевые сетки с остатками клеток аккуратно промывали в ледяном буфере и фиксировали в 2%-ном параформальдегиде (10 мин). Затем прикрепленные к сеткам мембраны клеток переворачивали на капли, содержащие первичные анти-TRPV5 и вторичные (конъюгированные с коллоидным золотом) антитела (указанные выше) и инкубировали в течение 30 мин. После промывки в PBS образцы фиксировали в растворе 2%-ного глутаральдегида (1 ч) и оставляли на ночь отмываться в PBS при 4°C. После этого образцы постфиксировали в 1%-ном OsO₄ (10 мин), промывали буфером и дистиллированной водой. Далее образцы обрабатывали 1%-ным водным раствором таниновой кислоты (10 мин) и окрашивали 1%-ным уранил-ацетатом (10 мин). После сушки мембранные фрагменты, прикрепленные к сеткам, анализировали на электронном микроскопе Libra-120 (Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Липидные микродомены в клетках Jurkat оценивали по уровню флуоресцентного свечения конъюгата FITC-СТВ, который селективно связывается с ганглиозидом GM1 (одним из маркерных компонентов рафтов). Окраска ганглиозида GM1 выявила

участки интенсивного свечения на плазматической мембране T-клетках линии Jurkat (рис. 1а, в).

Локализацию каналов TRPV5 в клетках исследовали с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания специфическими антителами против TRPV5 (как указано в разделе “Материал и методика”). Как представлено на рис. 1 иммунореактивность TRPV5 была в основном сосредоточена на плазматической мембране, а также частично присутствовала во внутриклеточном пространстве клеток. Для экстракции мембранного холестерина и деструкции липидных рафтов использовали акцептор холестерина МБЦД. Инкубация клеток с 1% МБЦД не изменила морфологию T-клеток (рис. 1), но значительно снизила окрашивание плазматической мембраны по сравнению с контрольными клетками. В клетках, обработанных деструктором липидных рафтов, наблюдали более диффузное распределение каналов TRPV5 чем в контрольных клетках (рис. 1). Как показали результаты, истощение мембранного холестерина привело к значительному снижению интенсивности флуоресцентного сигнала на мембране клеток, окрашенных с использованием анти-TRPV6 антител, но в то же время увеличило сигнал от антител, находящихся внутри клеток (рис. 1).

Визуализация дискретных белков методом иммунофлуоресценции является трудно разрешимым вопросом, учитывая их небольшой размер. Поэтому, чтобы преодолеть дифракционный предел световой микроскопии и анализировать пространственное распределение белков TRPV5 в T-клетках лейкемии человека использовали электронный микроскоп. Для электронно-микроскопического анализа предварительно обработанные МБЦД и контрольные клетки были инкубированы с антителами против TRPV5, и вторичными антителами, конъюгированными с золотом (как указано в разделе “Материал и методика”). Анализ изображений показал, что часть частиц коллоидного золота (10 нм) индивидуально распределена по клеточной мембране, тогда как другие находятся в кластерах размером около 50–100 нм в непосредственной близости от плазматической мембраны (рис. 2, л). Наличие скоплений частиц золота предполагает высокую локальную концентрацию молекул TRPV5, что согласуется с нашими электрофизиологическими (Vassilieva et al., 2013) и иммунофлуоресцентными данными, которые выявили кластеризацию каналов TRPV5 в плазматической мембране клеток (рис. 1). Очень важно, что распределение золотых частиц различалось в контрольных клетках и обработанных МБЦД. Фактически маркировка золотом наблюдалась и в плазматической мембране, и в цитозоле контрольных клеток (рис. 2, л). Однако после истощения мембранного холестерина с помощью МБЦД, частицы золота редко обнаруживались на плазматической мембране клеток. Более того, локальных скоплений частиц золота, метящих TRPV5, в виде кластеров практически

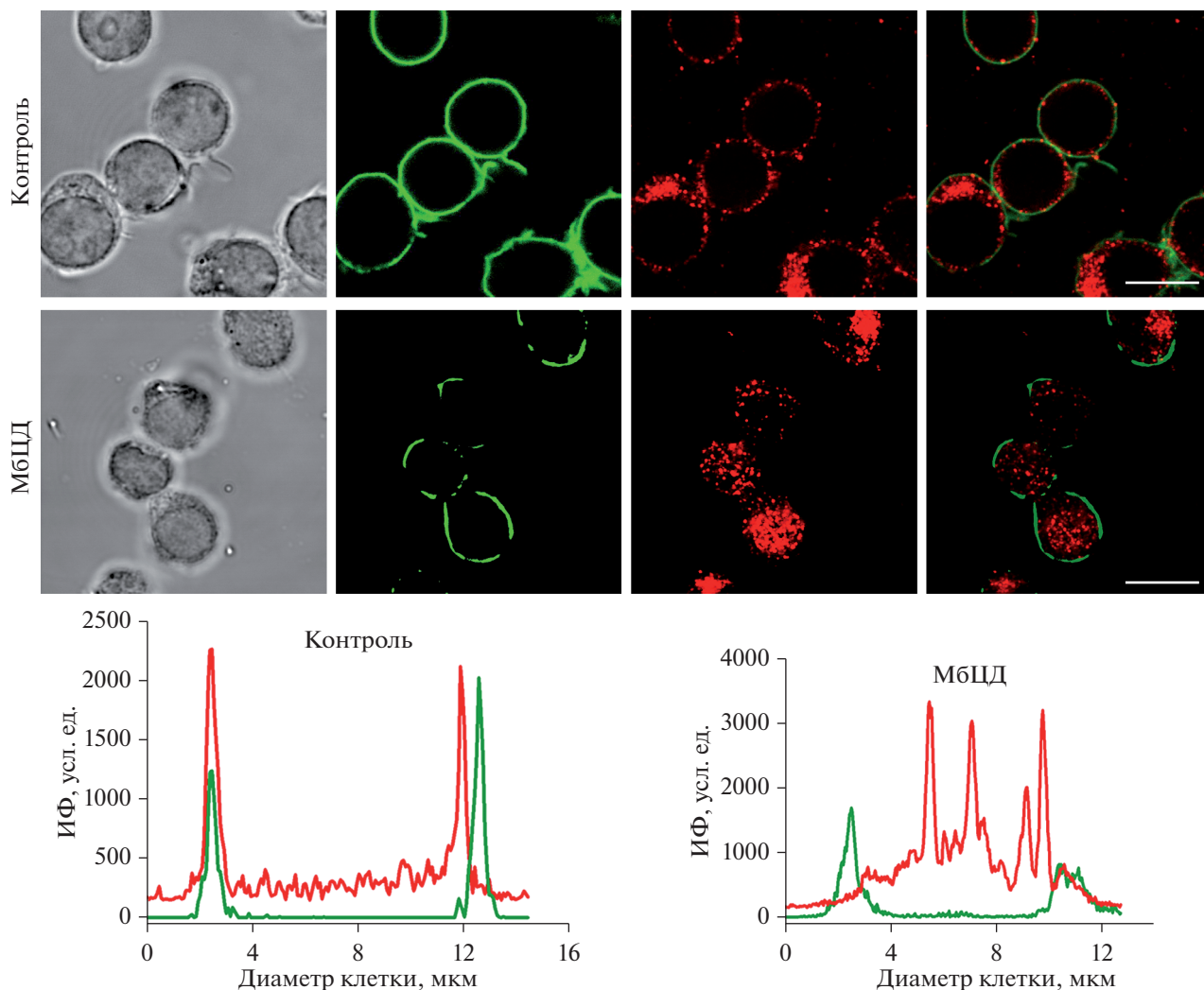


Рис. 1. Распределение кальциевых каналов TRPV5 в контрольных и обработанных МβЦД Т-клетках Jurkat, полученное с помощью иммунофлуоресценции. Представлены изображения клеток (слева направо): в проходящем свете, зелёная флуоресценция FITC-СТВ (маркер липидных рафтов), красная флуоресценция TRPV5, окрашенных антителами, меченными Су3, и совмещение изображений. Шкала – 10 мкм. Внизу гистограмма распределения интенсивности флуоресценции (ИФ) на мембране и в цитоплазме клеток до и после экстракции холестерина с помощью МβЦД соответственно. Сканирование вдоль диаметра клетки. Видно, что ИФ, соответствующая ганглиозиду GM1 и каналам TRPV5, после обработки клеток МβЦД существенно уменьшается на мембране клеток, а ИФ, соответствующая TRPV5, увеличивается в цитозоле.

не наблюдали в плазматической мембране клеток, обработанных МβЦД (рис. 2, I).

Чтобы получить дополнительные данные относительно мембранного распределения каналов TRPV5 в контрольных клетках и клетках с пониженным содержанием холестерина, мы модифицировали метод изоляции фрагментов плазматической мембраны клеток на никелевых сетках (Sanan, Anderson, 1991). Для этой цели клетки, закрепленные, с одной стороны, на никелевой сетке, а с другой – на покровном стекле, быстро разрывали резким отведением покровного стекла (см. раздел “Материал и методика”). Цитоплазму с внутриклеточным содержимым

отмывали, а мембранные фрагменты обрабатывали антителами и далее анализировали с помощью электронного микроскопа.

Распределение частиц золота, маркирующих TRPV5, в контрольных клетках проиллюстрировано в виде микрофотографий и количественно представлено на рис. 2, II. Микрофотография показывает, что частицы золота, маркирующие TRPV5, распределены по одиночке или в виде небольших рассеянных кластеров, которые редко превышают диаметр 100 нм (размер шкалы на рис. 2, II). Среднее число частиц золота, метящих TRPV5 (посчитанных вручную), в контрольных клетках, составило 124.9 ± 9.0

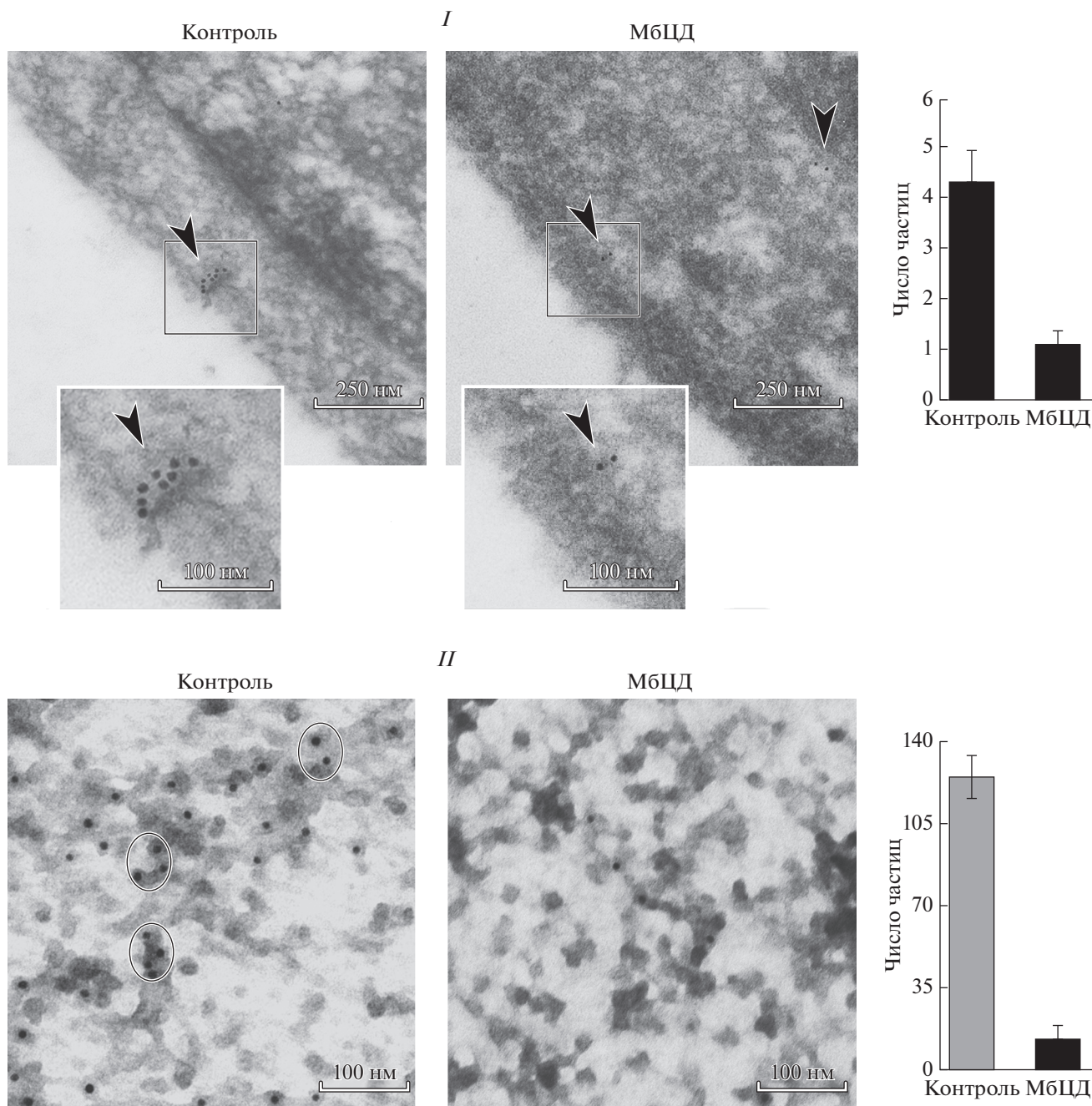


Рис. 2. Микрофотографии локализации каналов TRPV5 в клетках Jurkat (*I*) и их мембранных фрагментах (*II*) в контроле и после действия МβЦД. По данным иммуноэлектронной микроскопии. Каналы маркированы специфическими антителами, конъюгированными с частицами коллоидного золота (10 нм). Участки с частицами золота (*стрелки*) выделены *рамкой* (*I*) или *овалом* (*II*). В контрольных клетках частицы золота локализованы в кластерах на плазматической мембране, после экстракции холестерина частицы диффузно распределены в клетках (*стрелка*). На гистограмме (*справа*) – число частиц золота в контроле и после действия МβЦД; *вертикальные отрезки* – ошибка среднего, различия достоверны при $P < 0.05$.

($n = 12$) (рис. 2, *II*). Примерно половина частиц золота распределялась диффузно, а остальные находились в кластерах, которые чаще всего содержали 2–4 частицы, реже – до 10 частиц (рис. 2, *II*). После экстракции мембранного холестерина с помощью МβЦД в плазматической мембране клеток наблюда-

ли почти 10-кратное снижение числа золотых частиц (13.0 ± 0.88 , $n = 11$), которые диффузно распределялись по мембране (рис. 2, *II*). Важно отметить, что в клетках, обработанных МβЦД, скоплений золотых частиц в виде кластеров практически не обнаруживали.

ОБСУЖДЕНИЕ

Избирательная ассоциация ряда ионных каналов с определенными липидами плазматической мембраны и липидными рафтами критически необходима для регуляции их активности. В настоящей работе установлена взаимосвязь между локализацией кальциевых каналов TRPV5 в плазматической мембране Т-клеток лейкемии человека и целостностью липидных рафтов. С помощью иммунофлуоресценции и иммуноэлектронной микроскопии показана колокализация каналов с липидными рафтами. Экстракция мембранного холестерина приводила к деструкции липидных рафтов и диффузному распределению каналов в цитоплазме клеток. Полученные результаты указывают на то, что холестерин критически необходим для локализации каналов TRPV5 в плазматической мембране Т-клеток линии Jurkat. Более того, обнаруженное объединение каналов в кластеры указывает на важную роль липидных рафтов в регуляции активности каналов. Липиды мембранных рафтов могут оказывать влияние на активность канала либо посредством прямых белково-липидных взаимодействий, либо путем воздействия на физические свойства двухслойной мембраны (Martens et al., 2000; Hering et al., 2003). Кроме того, рафты, по-видимому, могут избирательно рекрутировать нужные сигнальные молекулы для эффективной и избирательной передачи сигнала. Прямое взаимодействие с рафт-ассоциированными белками, такими, как кавеолин, также может влиять на функции канала, изменяя ионную проводимость, или влияя на транспорт каналов и их экспозицию в плазматической мембране.

Ряд исследований показал, что модуляторами каналов TRP могут быть также липиды различных метаболических путей, включая метаболиты циклооксигеназы, липоксигеназы, фосфолипидов и лизофосфолипидов (Szallasi, Blumberg, 2007; Bang et al., 2010). Кроме того, на функции ионных каналов могут влиять сигнальные белки, которые накапливаются в липидных рафтах. Так, в липидных рафтах был обнаружен ряд рецепторов, связанных с G-белками, различные классы G-белков, аденилатциклаза, протеинкиназа С, синтаза оксида азота, тирозинкиназы, белки Ras, и митоген-активированные протеинкиназы и др. (Patel et al., 2008).

Согласно полученным результатам, липидные рафты регулируют активность каналов TRPV5 в Т-клетках человека, по-видимому, влияя на их локализацию и плотность в плазматической мембране. Полученные данные являются исключительно актуальными, поскольку известна ключевая роль липидных рафтов в рецепторной сигнализации и активации лимфоцитов (Montixi et al., 1998; Xavier et al., 1998; Zhang et al., 1998; Pangumaran et al., 1999). На Т-клетках было продемонстрировано участие липидных рафтов в ранних стадиях стимуляции Т-клеточного рецептора (Schade, Levine, 2002). Существуют доказатель-

ства участия липидных рафтов в аутоиммунитете. Некоторые исследования свидетельствуют о корреляции между уровнем липидов, формирующих липидные рафты, и регулированием иммунной системы (Jury et al., 2007). Есть данные, что сигнальные процессы в липидных микродоменах Т-клеток здоровых людей и пациентов с такими аутоиммунными заболеваниями, как системная красная волчанка и ревматоидный артрит, имеют серьезные различия (Jury et al., 2004, 2007).

Мы предполагаем, что сигнальные платформы, образуемые липидными рафтами в Т-клетках, могут рекрутировать наряду с сигнальными белками и кальциевые каналы TRPV5, чтобы обеспечить локальное повышение кальция для выполнения множества сигнальных функций, включая фосфорилирование белков.

БЛАГОДАРНОСТИ

Мы бесконечно признательны Я.Ю. Комиссарчику за его бесценные советы, которые он нам давал в ходе этой работы, за его отзывчивость, доброжелательность, безграничный интерес к научным исследованиям и выражаем искреннее сожаление в связи с его уходом из жизни.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-04-00231а).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторами не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bang S., Yoo S., Oh U., Hwang S.W. 2010. Endogenous lipid-derived ligands for sensory TRP ion channels and their pain modulation. *Arch. Pharm. Res.* V. 33. P. 1509.
- Barbuti A., Gravante B., Riolfo M., Milanesi R., Terragni B., Di-Francesco D. 2004. Localization of pacemaker channels in lipid rafts regulates channel kinetics. *Circ Res.* V. 94. P. 1325–1331.
- Clapham D.E. 2003. TRP channels as cellular sensors. *Nature.* V. 426. P. 517–524.
- Fernandes E.S., Fernandes M.A., Keeble J.E. 2012. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. *Br. J. Pharmacol.* V. 166. P. 510–521.
- Flockerzi V. 2007. An introduction on TRP channels. *Handb. Exp. Pharmacol.* V. 179. P. 1–19.
- Heino S., Lusa S., Somerharju P., Ehnholm C., Olkkonen V.M., Ikonen E. 2000. Dissecting the role of the golgi complex and lipid rafts in biosynthetic transport of cholesterol to the

- cell surface. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 97. P. 8375–8380.
- Hering H., Lin C.C., Sheng M. 2003. Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. J. Neurosci. V. 23. P. 3262–3271.
- Hoenderop J.G., Vennekens R., Müller D., Prenen J., Droogmans G., Bindels R.J., Nilius B. 2001. Function and expression of the epithelial Ca(2+) channel family: comparison of mammalian ECaC1 and 2. J. Physiol. V. 537. P. 747–761.
- Hoenderop J.G.J., Nilius B., Bindels R.J.M. 2002. Molecular mechanism of active Ca²⁺ reabsorption in the distal nephron. Annu. Rev. Physiol. V. 64. P. 529–549.
- Ilangumaran S., Arni S., van Echten-Deckert G., Borisch B., Hoessli D.C. 1999. Microdomain-dependent regulation of Lck and Fyn protein-tyrosine kinases in T lymphocyte plasma membranes. Mol. Biol. Cell. V. 10. P. 891–905.
- Jury E.C., Fabian Flores-Borja F., Kabouridis P.S. 2007. Lipid rafts in T cell signalling and disease. Semin. Cell Dev. Biol. V. 18. P. 608–615.
- Jury E.C., Kabouridis P.S., Flores-Borja F., Mageed R.A., Isenberg D.A. 2004. Altered lipid raft-associated signaling and ganglioside expression in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. J. Clin. Invest. V. 113. P. 1176–1187.
- Kever L., Cherezova A., Zenin V., Negulyaev Yu., Komissarchik Y., Semenova S. 2019. Downregulation of TRPV6 channel activity by cholesterol depletion in Jurkat T cell line. Cell Biol. Int. V. 43. P. 965–975.
- Kilsdonk E.P., Yancey P.G., Stoudt G.W., Bangert F.W., Johnson W.J., Phillips M.C., Rothblat G.H. 1995. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. J. Biol. Chem. V. 270. P. 17250–17256.
- Kobayashi A., Takanezawa Y., Hirata T., Shimizu Y., Misasa K., Kioka N., Arai H., Ueda K., Maisuo M. 2006. Efflux of sphingomyelin, cholesterol, and phosphatidylcholine by ABCG1. J. Lipid Res. V. 47. P. 1791–1802.
- Levitan I., Christian A.E., Tulenko T.N., Rothblat G.H. 2000. Membrane cholesterol content modulates activation of volume-regulated anion current in bovine endothelial cells. J. Gen. Physiol. V. 115. P. 405–416.
- Liu M., Huang W., Wu D., Priestley J.V. 2006. TRPV1, but not P2X, requires cholesterol for its function and membrane expression in rat nociceptors. Eur. J. Neurosci. V. 24. P. 1–6.
- Lundbaek J.A., Andersen O.S., Werge T., Nielsen C. 2003. Cholesterol-induced protein sorting: an analysis of energetic feasibility. Biophys. J. V. 84. P. 2080–2090.
- Martens J.R., Navarro-Polanco R., Coppock E.A., Nishiyama A., Parshley L., Grobaski T.D., Tamkun M.M. 2000. Differential targeting of Shaker-like potassium channels to lipid rafts. J. Biol. Chem. V. 275. P. 7443–7446.
- Montell C., Birnbaumer L., Flockerzi V. 2002. The TRP channels, a remarkably functional family. Cell. V. 108. P. 595–598.
- Montixi C., Langlet C., Bernard A.M., Thimonier J., Dubois C., Wurbel M.A., Chauvin J.P., Pierres M., He H.T. 1998. Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains. Eur. Mol. Biol. Organ. J. V. 17. P. 5334–5348.
- Morenilla-Palao C., Pertusa M., Meseguer V., Cabedo H., Viana F. 2009. Lipid raft segregation modulates TRPM8 channel activity. J. Biol. Chem. V. 284. P. 9215–9224.
- Nijenhuis T., Hoenderop J.G.J., Nilius B., Bindels R.J.M. 2003. (Patho)physiological implications of the novel epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. Pflugers Arch. V. 446. P. 401–409.
- Nilius B. 2007. TRP channels in disease. Biochim. Biophys. Acta. V. 1772. P. 805–812.
- Patel H.H., Murray F., Insel P.A. 2008. G-protein-coupled receptor-signaling components in membrane raft and caveolae microdomains. Handb. Exp. Pharmacol. V. 186. P. 167–184.
- Peng J.B., Hediger M.A. 2002. A family of calcium-permeable channels in the kidney: distinct roles in renal calcium handling. Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. V. 11. P. 555–561.
- Pizzo P., Viola A. 2003. Lymphocyte lipid rafts: structure and function. Curr. Opin. In Immun. V. 15. P. 255–260.
- Pucadyil T.J., Chattopadhyay A. 2004. Cholesterol modulates ligand binding and G-protein coupling to serotonin(1A) receptors from bovine hippocampus. Biochim. Biophys. Acta. V. 1663. P. 188–200.
- Sanan D.A., Anderson R.G. 1991. Simultaneous visualization of LDL receptor distribution and clathrin lattices on membranes torn from the upper surface of cultured cells. J. Histochem. Cytochem. V. 39. P. 1017–1024.
- Schade A.E., Levine A.D. 2002. Lipid Raft Heterogeneity in Human Peripheral Blood T Lymphoblasts: A Mechanism for Regulating the Initiation of TCR Signal Transduction. J. Immunol. V. 168. P. 2233–22397.
- Schengrund C.L. 2010. Lipid rafts: keys to neurodegeneration. Brain. Res. Bull. V. 29. P. 7–17.
- Sheng R., Chen Y., Yung Gee H., Stec E., Melowic H.R., Blatner N.R., Tun M.P., Kim Y., Källberg M., Fujiwara T.K., Hong J.H., Kim K.P., Lu H., Kusumi A., Lee M.G., Cho W. 2012. Cholesterol modulates cell signaling and protein networking by specifically interacting with PDZ domain-containing scaffold proteins. Nat. Commun. V. 3. P. 1249.
- Simons K., Toomre D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. Nature Rev. V. 1. P. 31–39.
- Slimane T.A., Lenoir C., Bello V., Delaunay J.L., Goding J.W., Chwetzoff S., Maurice M., Fransen J.A., Trugnan G. 2001. The cytoplasmic/transmembrane domain of dipeptidyl peptidase IV, a type II glycoprotein, contains an apical targeting signal that does not specifically interact with lipid rafts. Exp. Cell Res. V. 270. P. 45–55.
- Szallasi A., Blumberg P.M. 2007. Complex Regulation of TRPV1 by Vanilloids. Frontiers in Neuroscience. TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; Chapter 6.
- Szoke E., Börzsei R., Toth D.M., Leng O., Helyes Z., Sándor Z., Szolcsányi J. 2010. Effect of lipid raft disruption on TRPV1 receptor activation of trigeminal sensory neurons and transfected cell line. Eur. J. Pharmacol. V. 628. P. 67–74.
- Vassilieva I.O., Tomilin V.N., Marakhova I.I., Shatrova A.N., Negulyaev Y.A., Semenova S.B. 2013. Expression of Transient Receptor Potential Vanilloid Channels TRPV5 and TRPV6 in Human Blood Lymphocytes and Jurkat Leukemia T Cells. J. Membr. Biol. V. 246. P. 131–140.
- Vennekens R., Menigoz A., Nilius B. 2012. TRPs in the Brain. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. V. 163. P. 27–64.
- Xavier R., Brennan T., Li Q., McCormack C., Seed B. 1998. Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. Immunity. V. 8. P. 723–732.
- Yeagle P.L. 1985. Cholesterol and the cell membrane. Biochim. Biophys. Acta. V. 822. P. 267–287.
- Zhang W., Tribble R.P., Samelson L.E. 1998. LAT palmitoylation: it's essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. Immunity. V. 9. P. 239–246.

Blessed memory of Y.Yu. Komissarchik is devoted

ROLE OF CHOLESTEROL IN MEMBRANE LOCALIZATION OF TRPV5 CALCIUM CHANNELS IN HUMAN JURKAT T CELLS

L. V. Kever^a and S. B. Semenova^{a, *}

^aInstitute of Cytology RAS, St. Petersburg 194064 Russia

**e-mail: svsem@incras.ru*

Many ion channels are localized in areas of the plasma membrane enriched in cholesterol and sphingolipids, known as lipid rafts. The problem of the interaction of ion channels with lipid rafts is one of the least studied in modern biology and physiology. Here, we explored the role of lipid rafts in the membrane localization of TRPV5 calcium channels (transient receptor potential vanilloid, type 5), which we earlier discovered in human T cells line Jurkat. Immunofluorescence analysis of cells showed the membrane localization of TRPV5 proteins and their colocalization with lipid rafts. The membrane cholesterol depletion with methyl- β -cyclodextrin (MbCD) led to a decrease in the surface expression of channels and their diffuse distribution in the cell cytoplasm. An analysis of cell images obtained by immunoelectron microscopy revealed local aggregation of TRPV5 proteins in the clusters in the plasma membrane of cells. Extraction of membrane cholesterol and destruction of lipid rafts led to the disappearance of channel clusters and the dropping of TRPV5 channels out the plasma membrane of cells. In general, the results showed that the surface expression and localization of TRPV5 calcium channels in the form of clusters in the plasma membrane is critically dependent on the level of cholesterol and the integrity of lipid rafts in Jurkat T cells.

Keywords: TRPV5 calcium channels, cholesterol, lipid rafts, immunoelectron microscopy, Jurkat T cells