

ДЕТЕРГЕНТ-РЕЗИСТЕНТНЫЕ МЕМБРАНЫ В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА: ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ЦИНКА НА ИХ МОДИФИКАЦИЮ

Гармаза Ю.М.

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»
ул. Академическая 27, г. Минск, 220072, Беларусь; e-mail: garmaza@yandex.ru
Поступила в редакцию: 19.07.20

Аннотация. Установлено, что ионы цинка при действии на эритроциты человека *in vitro* не оказывают видимого влияния на количество и степень упаковки детергент-резистентных мембран (липидных рафтов), с одной стороны, но в то же время модифицируют их структуру (изменяя локализацию как белка-маркера ллипидных рафтов – стоматина, так и интегрального белка – белка полосы 3) и изменяют латеральное распределение холестерина в цитоплазматической мембране. Показано, что разрушение детергент-резистентных участков мембраны эритроцитов в результате экстракции холестерина *in vitro* приводит к потере функциональной активности мембраносвязанного интегрального белка-транспортера MRP1.

Ключевые слова: эритроциты человека, липидные рафты, мембранный холестерин, ионы цинка, белок MRP1.

Известно, что структурное и функциональное состояние плазматической мембраны играет важную роль в формировании ответа клетки на действие различных ксенобиотиков. В свою очередь, липиды в биологических мембранах выполняют различные функции: обеспечивают структурную организацию и стабильность клеточных мембран; выполняют барьерную и транспортную функции; играют фундаментальную роль в передаче информации и регулировании метаболических процессов в клетке [1, 2]. В последнее время наблюдается значительный интерес исследователей к физиологической роли именно холестерина, как одного из важнейших компонентов мембран эукариотических клеток. Показано, что плазматическая мембрана содержит более высокий уровень холестерина по сравнению с внутриклеточными мембранами органелл [3], а в эритроцитах человека содержание холестерина достигает до 30% от всех мембранных липидов [2]. Известно, что холестерин включается в специализированные микродомены или “рафты” и играет ключевую роль в их формировании [4, 5]. Известно, что эти микродомены ассоциируются с цитоскелетом клетки и являются платформами для локализации различных мембранных белков. В эритроцитах, например, это стоматин, G-белки, флотиллины [6]. Считается, что именно липидные рафты играют важную роль в процессах внутриклеточной сигнализации и мембранного транспорта [5].

Как известно, функционирование интегральных мембранных белков часто находится под влиянием состава и физического состояния липидных молекул, которые окружают их в мембране [2]. В связи с этим в настоящее время активно обсуждается вопрос о зависимости функции мембраносвязанных белков-транспортеров от их липидного окружения, в частности от их локализации в специализированных микродоменах или “рафтах” мембран, одним из ключевых компонентов которых и является холестерин.

Ранее нами было обнаружено, что 2-х часовое воздействие сульфата цинка в фармакологических и токсичных концентрациях на эритроциты человека *in vitro* приводит к 20–30% аккумуляции в них Zn^{2+} , что сопровождалось увеличением уровня свободных SH- и NH_2 -групп на поверхности их мембран, а также модификацией физического состояния липидного бислоя [7, 8]. Также было показано, что это играет важную роль в нарушении транспортной функции мембраносвязанных белков-транспортеров ксенобиотиков семейства MRP (а именно MRP1 белка) в эритроцитах человека, функционирование которых ассоциировано с состоянием липидного бислоя. В связи с этим, была выдвинута гипотеза, что одним из возможных механизмов обнаруженных Zn-индуцированных изменений является нарушение структуры и функции специализированных гликолипидных микродоменов или липидных рафтов [9, 10].

Цель работы – проверка гипотезы, что одним из механизмов Zn-индуцированных мембранотропных изменений, а также модификации функционирования интегрального белка MRP1 в эритроцитах человека, является модификация латерального распределения холестерина и структуры липидных рафтов в цитоплазматической мембране.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использована кровь здоровых доноров в консерванте “гепарин”, полученная из Pavia Hospital Yauso (Павия, Италия) и РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий (Минск, Беларусь).

Эритроциты отделяли от плазмы путем центрифугирования крови при 2000g в течение 10 мин и трижды отмывали в 155 mM NaCl. Эритроцитарные мембраны выделяли по методу Доджа и сотр. Концентрацию белка в телях эритроцитов измеряли по модифицированному методу Лоури. Нагрузку эритроцитов ионами цинка проводили путем инкубации суспензии клеток с сульфатом цинка в фармакологической (0,05 mM) и токсичной (0,5 mM) концентрациях в 10 mM трис-HCl буфере, содержащем 155 mM NaCl, pH 7,4 (2 ч, 37°C).

Липидные рафты (или изолированные из эритроцитарных мембран детергент-резистентные участки мембран, DRMs) были экстрагированы из цельных эритроцитов до и после нагрузки их ионами цинка в градиенте сахарозы (80%) в 5 мМ HEPES буфере (HKM буфер), содержащий 150 мМ KCl, 8 мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂, pH 7,4 с добавлением 1%-го тритона X-100 (1-й подход) или сахарозы (80%) в 0,3М K₂CO₃ (2-й подход) и подвержены центрифугированию 225000 g при 4°C в течение 16 ч, используя центрифугу (Optima Max BC, Италия). После ультрацентрифугирования суспензия эритроцитов разделялась на 6 фракций, которые были собраны по 1 мл и подвержены дальнейшему анализу.

Оценку модификации DRMs проводили по анализу следующих мембранносвязанных белков: флоттилин-2, стоматин, белок полосы 3, с помощью методов электрофореза в полиакриламидном геле и вестерн-блоттинга с применением специфических антител: моноклональные антитела мыши анти-флоттилин-2 (BD, разведение 1:2000), моноклональные антитела кролика анти-стоматин (H-49) (SC, 1:1000), моноклональные антитела мыши анти-B3 (Sigma, 1:15000). Связывание первичных антител оценивалось после инкубации со вторичными антителами (антитела против IgG мыши или кролика, соответственно, Sigma, 1:15000), конъюгированными с пероксидазой хрена, с последующей хемиллюминесцентной детекцией (BD, Италия).

О модификации латерального распределения холестерина в мембранах эритроцитов, подвергшихся воздействию ионов цинка, судили по величине интенсивности флуоресценции полиенового антибиотика филипина. Для этого изолированные мембраны эритроцитов, предварительно нагруженные сульфатом цинка, инкубировали 2 ч при комнатной температуре в темноте с раствором филипина в ДМСО (конечная концентрация филипина в образце 5 мкМ). Интенсивность флуоресценции ($I_{\text{фл}}$) измеряли при $\lambda_{\text{возб/рег}}=340/482$ нм

Для истощения эритроцитов по холестерину клетки до нагрузки ионами цинка инкубировали в присутствии метил- β -циклодекстрина (M β CD) в концентрации 0,5 мМ в течение 30 мин при 37°C, затем суспензию эритроцитов центрифугировали при 2000g 10 мин. Супернатант удаляли, а осадок ресуспензировали в трис-HCl буфере (pH 7,4), содержащий 155 мМ NaCl. Содержание мембранного холестерина до и после истощения в эритроцитах определяли с помощью стандартного набора ("Анализ-Х", Беларусь), солубилизацию мембран проводили в 2 % растворе тритона X-100.

Об изменении функциональной активности белка-транспортера MRP1 в эритроцитах судили по скорости транспорта конъюгатов биман-S-глутатиона (B-SG) по флуоресцентному методу. Для этого эритроциты, предварительно обработанные M β CD или M β CD+сульфат цинка, ресуспензировали в буфере А, содержащем 138 мМ NaCl; 5 мМ KCl; 6,1 мМ Na₂HPO₄; 1,4 мМ NaH₂PO₄; 1 мМ MgCl₂; 1 мг/мл глюкозы pH 7,4, инкубировали в течение 5 мин с 10 мкМ монохлорбимана (mBCl) при комнатной температуре. Затем клетки ресуспензировали в буфере А до 5%-го гематокрита, инкубировали при 37°C и через определенные промежутки времени (0 мин; 3 мин; 6 мин; 9 мин и 12 мин) центрифугировали при 2000g, 5 мин. Собирали супернатанты и измеряли интенсивность флуоресценции при $\lambda_{\text{возб/рег}}=386/476$ нм. Спонтанный гемолиз в экспериментах не превышал 1-2%.

Флуоресцентные измерения проводили на спектрофлуориметре CM2203 ("СОЛАР", Беларусь), спектрофотометрические – на спектрофотометре Srecord M-40 (Германия). Результаты экспериментов анализировали методом вариационной статистики с использованием непараметрического критерия Уилкоксона в программе STATISTICA 8.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения участия холестерина в ответах мембраны на действие ионов цинка нами были экстрагированы детергент-резистентные участки мембран (DRMs) из эритроцитов, обработанных сульфатом цинка в концентрациях 0,05 и 0,5 мМ. Для этого использовалась методика, предложенная авторами работы [11, 12], когда суспензия эритроцитов в градиенте плотности сахарозы в 0,3М K₂CO₃ подвергалась ультрацентрифугированию (225 000 g при 4°C в течение 16 ч) в результате чего происходит разделение клетки на 6 фракций, которые анализировались на наличие в них следующих мембранносвязанных белков: флоттилин-2, стоматин, белок полосы 3. Стоит отметить, что именно 2-я фракция представляет собой DRMs (рис. 1) [11]. Более того, из рисунка 1 видно, что в результате применения 1-го подхода с использованием HEPES буфера для растворения сахарозы (3 пробирка) не происходит четкого фракционирования DRM-полосы. Именно карбонаты необходимы для получения DRM-полосы с плотностью, которая соответствует плотности DRMs, описанной в литературе для других типов клеток (5-30 % сахароза) [11]. Анализ фракции DRMs в суспензии как интактных, так и Zn-нагруженных эритроцитов не выявил видимых различий в количестве полос и степени их упаковки до и после воздействия ионов цинка (рисунок 1). Таким образом, можно заключить, что взаимодействие Zn²⁺ с мембранами эритроцитов не оказывает влияния на уровень мембранного холестерина и/или сфинголипида (как основных рафтовых липидов).

Параллельно с этим с помощью полиенового антибиотика филипина была изучено изменение латерального распределения холестерина в мембранах в ответ на модификацию эритроцитов сульфатом цинка. В настоящее время установлено, что филипин, обладающий собственной флуоресценцией с максимумом при 482 нм ($\lambda_{\text{возб}}=340$ нм) и взаимодействующий с холестерин-содержащими участками мембран клеток. В связи с этим он может быть использован как зонд на присутствие и гетерогенность распределения стеролов в биологических мембранах [13]. Из представленных на рисунке 2 данных видно, что при воздействии на эритроцитарные

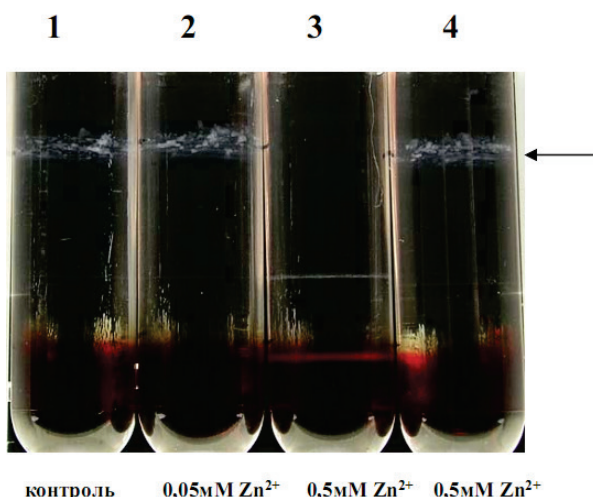


Рисунок 1. Изолирование детергент-резистентных участков мембран (“рафтов”) из эритроцитов человека до и после обработки сульфатом цинка. Эритроциты, нагруженные Zn^{2+} и интактные, обрабатывались тритоном X-100 в НКМ буфере, смешивались с равными объемами 80% сахарозы в НКМ буфере (пробирка 3) или 80% сахарозы в 0,3 М K_2CO_3 (пробирки 1, 2, 4) и ультрацентрифугировались в течение 16 ч (220000g, 4°C). Стрелкой обозначена фракция DRMs.

мембраны сульфата цинка в концентрациях 0,05 и 0,5 мМ происходит дозозависимое снижение интенсивности флуоресценции филипина. Это указывает на увеличение количества доступного холестерина для этого антибиотика, что может свидетельствовать о модификации его латерального распределения в плазматических мембранах, несмотря на отсутствие изменения уровня мембранного холестерина (рис. 1).

На следующем этапе работы были изучены локализация и количество как белков-маркеров DRMs (флоттилин-2 и стоматин) [2, 5], так и нерафтовых белков – белка полосы 3 [2], в каждой изолированной фракции. Было показано, что белок-маркер DRM – флоттилин-2 (47 кДа), находится только во фракции липидных рафтов, в то время, как во фракциях 3-6 он не обнаружен ни в контрольных образцах, ни в образцах, подвергшихся воздействию Zn^{2+} (рис. 3А). При этом плотность белка и его локализация не зависела от концентрации Zn^{2+} в среде инкубации и отличий от контрольных образцов обнаружено не было. В то же время, были обнаружены различия в количестве и локализации другого белка-маркера DRM – стоматина (32 кДа) (рис. 3Б). В образцах, подвергшихся воздействию Zn^{2+} в исследуемых концентрациях, белок был обнаружен также в нерафтовых фракциях, чего не наблюдалось в образцах интактных клеток, а плотность полосы белка в рафтовой зоне была выше, по сравнению с интактными клетками.

Как известно, одним из участников активного транспорта может быть основной интегральный белок мембраны эритроцитов – белок полосы 3, важнейшей функцией которого является транспорт анионов через

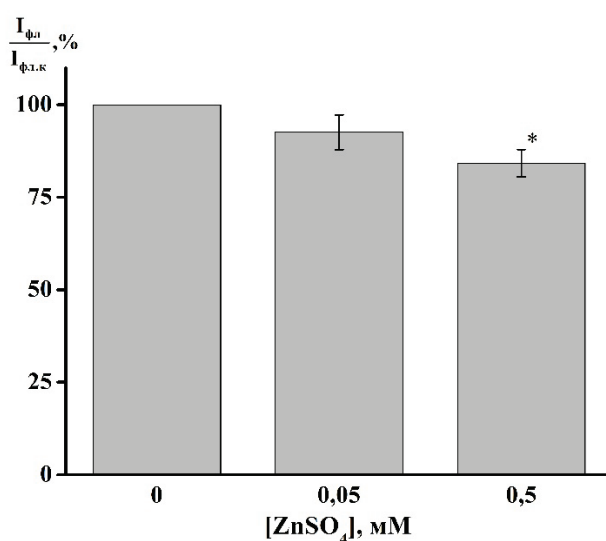


Рисунок 2. Относительная интенсивность флуоресценции полиенового антибиотика филипина, встроенного в мембраны эритроцитов человека, модифицированных сульфатом цинка в широком спектре концентраций. За 100% принято значение интенсивности флуоресценции филипина в интактных мембранах (контроль); * – различия по сравнению с контролем достоверны ($P < 0,05$); $\lambda_{возб} = 340$ нм; $\lambda_{рег} = 482$ нм

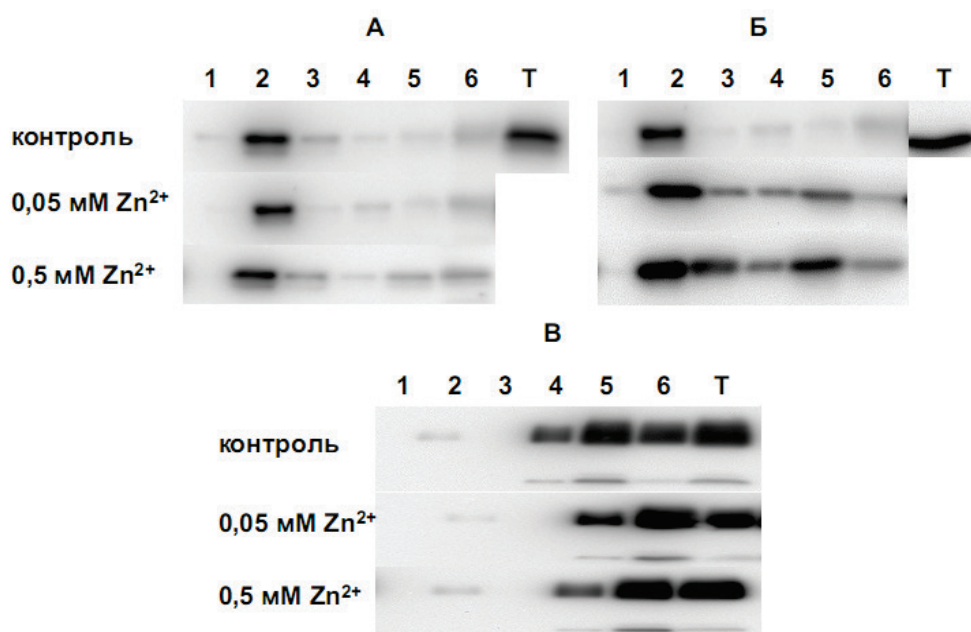


Рисунок 3. Анализ белков-маркеров DRM флотиллина (flot-2, MW=45) (а) и стоматина (stom, MW=31) (б), а также нерафтового белка – белка полосы 3 (B3, MW=95) (в), используя моноклональные антитела. Образцы общей популяции эритроцитов (Т) перед лизисом с помощью тритона X–100 были использованы в качестве сравнения

плазматическую мембрану. Используя метод вестерн-блоттинга, нами было выявлено уменьшение количества белка полосы 3 в рафтовой зоне клеток, подвергшихся воздействию Zn²⁺ по сравнению с контрольными образцами (рис. 3В). Ранее было установлено, что Zn²⁺ в концентрации 0,05 мМ индуцирует конформационные изменения в цитоплазматическом домене белка полосы 3, которые, в свою очередь, передаются мембранному домену, в результате чего происходит ингибирование его анион-транспортной активности [14]. Эти данные согласуются с результатами, полученными нами ранее, о Zn-индуцированной модификации транспортной функции другого интегрального белка-транспортера семейства MRP – MRP1, отвечающего за экспорт ксенобиотиков из эритроцитов [9, 10].

Для уточнения вопроса о возможном участии мембранного холестерина в изменениях функциональной активности белка-транспортера MRP1 в эритроцитах человека, модифицированных ионами цинка, был использован циклический олигосахарид метил- β -циклодекстрин (M β CD), обладающий наибольшим сродством к этому липиду и эффективно экстрагирующий его из клеточных мембран [15]. Известно, что степень истощения мембранного холестерина зависит от концентрации M β CD, времени инкубации с ним, температуры и типа клеток. Ранее нами были подобраны все необходимые экспериментальные условия для эффективной экстракции холестерина из эритроцитарной мембраны с помощью M β CD [16].

Как видно из репрезентативных данных, представленных на рисунке 4, после экстракции 20–25% холестерина из мембран эритроцитов наблюдалось снижение скорости выхода конъюгатов биман-S-глутатион из клеток до 45% (кривая 2), свидетельствующее об ингибировании функциональной активности белка-транспортера MRP1. В тоже время инкубация эритроцитов, предварительно истощенных по холестерину, с сульфатом цинка не приводила к видимым изменениям транспортной активности этого белка по сравнению с M β CD-обработанными клетками (кривые 2 и 3), что свидетельствует о полной потере функциональной активности данного белка при разрушении детергент-резистентных участков мембраны. Полученные результаты свидетельствуют, что ионы цинка индуцировали активацию MRP1 транспортера [9, 10] за счет модификации именно мембранного холестерина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, ионы цинка при взаимодействии с плазматической мембраной эритроцитов модифицируют латеральное распределение мембранного холестерина, что, в свою очередь, играет важную роль в функционировании интегрального белка-транспортера MRP1. Одним из возможных механизмов этих Zn-индуцированных изменений является нарушение структуры (модифицируя локализацию как белка-маркера “рафтов” – стоматина, так и интегрального белка – белка полосы 3) и функции специализированных гликолипидных микродоменов или “рафтов”, в состав которых входит холестерин.

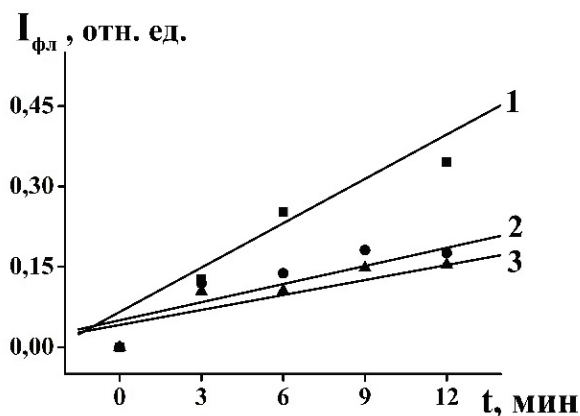


Рисунок 4. Влияние метил- β -циклодекстрина на кинетику выхода конъюгатов биман-S-глутатион из эритроцитов человека

1 – интактные эритроциты; 2 – эритроциты, подвергшиеся воздействию М β CD в концентрации 4мМ; 3 – эритроциты, подвергшиеся воздействию 4 мМ М β CD+0,1 мМ ZnSO₄; t – время инкубации при 37°C; I_{фл} – интенсивность флуоресценции конъюгатов биман-S-глутатион; ($\lambda_{\text{возб./рег.}}$ =386/476 нм)

Работа частично выполнена при финансовой поддержке Фонда Карипло (Италия). Выражаю благодарность заведующему лабораторией биохимии Университета Павии, Факультета биологии и биотехнологии (г. Павия, Италия) проф. Дж. Минетти и ведущему научному сотруднику данной лаборатории PhD А. Чиана за помощь в постановке экспериментов по выделению и изучению липидных рафтов.

Список литературы / References:

- Manno S., Takakuwa Y., Mohandas N. Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, vol. 99, no. 4, pp. 1943-1948. DOI: 10.1073/pnas.042688399.
- Черницкий Е.А., Воробей А.В. *Структура и функции эритроцитарных мембран*. Минск: Наука и техника, 1981, 215 с. [Chernitsky E.A., Vorobei A.V. *Structure and functions of erythrocyte's membranes*. Mn: «Science and Technology», 1981, 215 p. (In Russ.)]
- Slotte J.P., Bierman E.L. Depletion of plasma-membrane sphingomyelin rapidly alters the distribution of cholesterol between plasma membranes and intracellular cholesterol pools in cultured fibroblasts. *Biochemical Journal*, 1988, vol. 250, pp. 653-658. DOI: 10.1042/bj2500653.
- Simons K., Ikonen E. How cells handle cholesterol. *Science*, 2000, vol. 290, pp. 1721-1726. DOI: 10.1126/science.290.5497.1721.
- Петрович В.А., Слобожанина Е.И. Липидные рафты в биологических мембранах. *Новости медико-биологических наук*, 2013, т. 7, № 1, с. 69-75. [Petrovich V.A., Slobozhanina E.I. Lipid rafts in biological membrane. *News of biomedical sciences*, 2013, vol. 7, no. 1, pp. 69-75. (In Russ.)]
- Salzer U., Prohaska R. Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts. *Blood*, 2001, vol. 97, pp. 1141-1143. DOI: 10.1182/blood.V97.4.1141.
- Гармаза Ю.М. Холестерин и Zn-индуцированные изменения мембран. *Наука и инновации*, 2008, № 9 (67), с. 40-42. [Harmaza Y.M. Cholesterol and Zn-induced membranes alterations. *Science and innovations*, 2008, no. 9 (67), pp. 40-42. (In Russ.)]
- Khairullina A.Ya., Ol'shanskaya T.V., Filimonenko D.S., Kozlova N.M., Garmaza Yu.M., Slobozhanina E.I. Optical, nanostructural, and biophysical properties of Zn-induced changes in human erythrocyte membranes. *Optics and Spectroscopy*, 2011, vol. 110, no. 4, pp. 534-540. DOI: 10.1134/S0030400X11040138.
- Гармаза Ю.М., Тамашевский А.В. Изменение функциональной активности белков, ответственных за экспорт ксенобиотиков из эритроцитов человека, при действии ионов цинка. *Приложение к журналу "Известия НАН Беларуси"*, 2012, ч. 3, с. 40-43. [Harmaza Y.M., Tamashevski A.V. Change of the functional activity of proteins responsible for export xenobiotics from human erythrocytes under zinc ions influence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2012, iss. 3, pp. 40-43. (In Russ.)]
- Гармаза Ю.М., Тамашевский А.В. Редокс-статус и функциональная активность ABCC белков в эритроцитах человека при действии ионов цинка. *Медицинский академический журнал*, 2012, с. 258-260. [Harmaza Y.M., Tamashevski A.V. Redox state and functional activity of ABCC proteins in human erythrocytes under zinc ions actions. *Medical Academic Journal*, 2012, pp. 258-260. (In Russ.)]
- Ciana A., Achilli C., Balduini C., Minetti G. On the association of lipid rafts to the spectrin skeleton in human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011, vol. 1808, pp. 183-190. DOI: 10.1016/j.bbamem.2010.08.019.
- Ciana A., Achilli C., Minetti G. Membrane rafts of the human red blood cell. *Molecular Membrane Biology*, 2014, vol. 31, no. 2-3, pp. 47-57. DOI: 10.3109/09687688.2014.896485.

13. Castanho M., Coutinho A., Prieto M. Absorption and fluorescence spectra of polyene antibiotics in the presence of cholesterol. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, vol. 267, no. 1, pp. 204-249.
14. Xu H., Zhang X., Yang F.Y. Further studies on Zn²⁺-mediated domain-domain communication in human erythrocyte band 3. *Bioscience Reports*, 1998, vol. 18, no. 5, pp. 265-277. DOI: 10.1023/A:1020161032473.
15. Ohtani Y., Irie T., Uekama K., Fukunaga K., Pitha J. Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. *European Journal of Biochemistry*, 1989, vol. 186, no. 1-2, pp. 17-22. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1989.tb15171.x.
16. Гармаза Ю.М. Транспорт конъюгатов глутатиона в эритроцитах человека при истощении холестерина. Приложение к журналу "Известия НАН Беларуси", 2010, ч. 4, с. 50-54. [Harmaza Y.M. Transport of GSH-conjugates in human erythrocytes after cholesterol depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2010, iss. 4, pp. 50-54. (In Russ.)]

DETERGENT-RESISTANT MEMBRANES IN HUMAN ERYTHROCYTES: INFLUENCE OF ZINC IONS ON THEIR MODIFICATION

Harmaza Y.M.

Institute of Biophysics and Cell Engineering of National Academy of Sciences of Belarus
Akademicheskaya st., 27, Minsk, 220072, Belarus; e-mail: garmaza@yandex.ru

Abstract. It was obtained that zinc ions under interaction with human erythrocytes *in vitro* haven't a visible effect on the quantity and degree of packing of detergent-resistant membranes (DRMs) or lipid rafts. At the same time, zinc ions can modify the lipid rafts structure (changing the localization as a protein-DRM marker – stomatin, as an integral protein – protein band 3) and lateral distribution of cholesterol in the erythrocyte membranes. Moreover, it was shown that DRMs destruction in human erythrocytes as a result of *in vitro* extraction of membrane cholesterol leads to a loss of the functional activity of the membrane-bound integral protein-transporter MRP1.

Key words: human erythrocytes, lipid rafts, membrane cholesterol, zinc ions, protein MRP1.