

## ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ДНК У СТИМУЛИРОВАННЫХ ЭФР ИНФУЗОРИЙ *TETRAHYMENA PYRIFORMIS* ПОД ДЕЙСТВИЕМ КОФЕИНА, KCl И ИНГИБИТОРОВ PLC И PKC

© И. В. Шемарова,<sup>1</sup> Г. В. Селиванова,<sup>2</sup> Т. Д. Власова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН

и <sup>2</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;  
электронный адрес: irina@lis.mail.iephb.ru

Установлено, что у инфузорий *Tetrahymena pyriformis* под действием кофеина и ингибиторов PLC и PKC (соединения U 73122 и хелеритрина соответственно) происходит изменение скорости синтеза ДНК. Кофеин в концентрации 10 мМ стимулирует синтез ДНК, и, напротив, соединение U 73122 и хелеритрин в концентрациях 1 и 25 мкМ соответственно тормозят синтез ДНК. Применение 50 и 500 мМ KCl — агента, деполаризирующего ПМ и индуцирующего вход в клетку экзогенного Ca<sup>2+</sup>, оказалось неэффективным. Предполагается, что передача пролиферативных сигналов у *T. pyriformis* носит Ca<sup>2+</sup>-зависимый характер.

Ключевые слова: *Tetrahymena pyriformis*, внутриклеточная сигнализация, пролиферация, кофеин, ЭФР, Ca<sup>2+</sup>, PLC и PKC.

Принятые сокращения: ПМ — плазматическая мембрана, СПС — свежая питательная среда, ЭФР — эпидермальный фактор роста, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> — внутриклеточная концентрация кальция, MAP-киназа — митогенактивируемая протеинкиназа, PI — фосфатидилинозитол, PKC — протеинкиназа C, PLC — фосфолипаза C.

Ранее нам удалось показать, что ЭФР млекопитающих оказывает стимулирующее влияние на пролиферативную активность инфузорий *Tetrahymena pyriformis*. Мы выяснили, что ЭФР в концентрации 10<sup>-8</sup> М ускоряет синтез белка и РНК и тем самым вносит существенный вклад в увеличение скорости синтеза ДНК и соответственно скорости клеточного роста (Шемарова и др., 2004). Однако сигнальные механизмы, обеспечивающие регуляцию этого процесса у микроорганизмов, по-прежнему неясны. В частности, остается открытым вопрос о том, каким образом микроорганизмы распознают индуцированные ЭФР сигналы. Действуют ли эти сигналы через механизм стимулирования мембранных белков, подобных рецепторам тирозинкиназного типа, и запуска специализированного MAP-киназного пути, как у высших эукариот, либо они влияют на рост инфузорий с помощью более простых альтернативных механизмов. В предыдущем исследовании мы установили, что у тетрахимен ЭФР инициирует митогенный путь, который включает в себя мембранные белки тирозинкиназного типа (без сайтов фосфорилирования по тирозину), аденилатциклазу, тирозин- и Ca<sup>2+</sup>-зависимые ERK-подобные киназы (Шемарова и др., 2007).

Наличие у тетрахимен некоторых элементов специализированного MAP-киназного пути, типичного для клеток высших эукариот, говорит об эволюционной преемственности механизмов внутриклеточной сигнализации. Однако высокая пролиферативная активность этих микроорганизмов при достаточно низкой специфичности воз-

действия ингибиторов ключевых MAP-киназ (Шемарова и др., 2007) может указывать на существование у них дополнительных и, возможно, не характерных для клеток высших эукариот механизмов передачи пролиферативных сигналов.

Известно, что ведущую роль в трансдукции пускового сигнала в пролиферативный играет взаимодействие рецептора со своим лигандом, причем во многих клеточных системах это взаимодействие опосредует не только активацию нисходящих мишеней специализированного сигнального пути, но приводит к появлению локального Ca<sup>2+</sup>-сигнала, также являющегося индуктором пролиферации (Capiod et al., 2007; Roderick, Cook, 2008). Данная закономерность отмечена и в отношении взаимодействия рецепторов тирозинкиназного типа млекопитающих с ЭФР (Авдонин, Ткачук, 1994; Boonstra et al., 1995). При этом рецепторзависимое повышение внутриклеточной концентрации Ca<sup>2+</sup> происходит с помощью гетеротримерных G-белков, активирующих фосфоинозитидный сигнальный путь и соответственно его ключевые ферменты — PLC и PKC (Strobl et al., 1995; Pai, Tarnawski, 1998).

Задача наших исследований — выяснить, повлияет ли предобработка стимулированных ЭФР инфузорий *T. pyriformis* GL кофеином — активатором риадиноновых рецепторов, индуцирующих высвобождение внутриклеточного Ca<sup>2+</sup>, KCl — веществом, деполаризирующим мембрану и тем самым стимулирующим вход в клетки внутриклеточного Ca<sup>2+</sup>, а также ингибиторами PLC и PKC на синтез ДНК.

Содержание ДНК (отн. ед.,  $\bar{x} \pm s_x$ ) в ядрах *Tetrahymena pyriformis* при действии разных агентов

Время фиксации, ч	Контроль	ЭФР	Кофеин <sup>a</sup>	KCl	ЭФР+KCl	ЭФР+U 73122	ЭФР+хелеритрин
0	4.11 ± 0.11	—	—	—	—	—	—
0.5	5.70 ± 0.14	4.95 ± 0.22	5.18 ± 0.15	3.92 ± 0.12	2.77 ± 0.12	2.55 ± 0.12	3.45 ± 0.12
1.0	5.87 ± 0.15	4.80 ± 0.13	5.40 ± 0.10	3.33 ± 0.09	3.01 ± 0.10	2.90 ± 0.09	3.15 ± 0.18
1.5	5.62 ± 0.13	4.91 ± 0.13	4.47 ± 0.12	3.22 ± 0.09	2.55 ± 0.09	3.85 ± 0.09	2.87 ± 0.20
2.0	5.15 ± 0.27	4.65 ± 0.13	7.40 ± 0.25	3.22 ± 0.12	2.57 ± 0.24	3.17 ± 0.09	3.16 ± 0.27
2.5	5.22 ± 0.14	4.52 ± 0.28	5.61 ± 0.18	3.59 ± 0.11	2.55 ± 0.27	3.02 ± 0.09	3.05 ± 0.25
3.0	5.31 ± 0.14	4.44 ± 0.28	4.96 ± 0.13	3.61 ± 0.12	2.78 ± 0.10	2.85 ± 0.13	3.25 ± 0.26
3.5	5.83 ± 0.24	6.14 ± 0.17	5.96 ± 0.18	3.59 ± 0.20	3.62 ± 0.18	3.62 ± 0.22	3.28 ± 0.27
4.0	5.24 ± 0.14	7.02 ± 0.30	7.22 ± 0.24	3.49 ± 0.14	3.33 ± 0.13	2.63 ± 0.08	3.33 ± 0.27

<sup>a</sup> Содержание ДНК в пробе «кофеин+ЭФР» определяли только на сроке 4.0 ч, и оно составило  $3.11 \pm 0.29$ .

## Материал и методика

Экспериментальная часть работы выполнена на инфузориях *Tetrahymena pyriformis* (амикронуклеусный штамм GL), выращиваемых аксенически при 28 °С в среде следующего состава: 100 мг/л NaCl, по 10 мг/л KCl, CaCl<sub>2</sub> и MgCl<sub>2</sub>, 20 мг/л NaHCO<sub>3</sub>, 1 г/л сухого экстракта бычьей печени (Difco, США), 15 г/л пептона (Richter, Венгрия), 2 г/л сухого дрожжевого экстракта (Serva, Германия) и 0.1 мл/л трисульфата. Условия выращивания клеток описаны ранее (Шемарова и др., 2002). В качестве исходной использовали 48-часовую культуру тетрахимен, в которой клетки находились в стационарной фазе роста (Ирлина, Меркулова, 1975). Преинкубацию клеток с испытываемыми веществами проводили на протяжении 30 мин, затем клетки центрифугировали 5 мин при 2000 об/мин, отмывали от вещества минеральной средой Лозина-Лозинского и повторно центрифугировали при тех же условиях. Для индукции пролиферации к осадку клеток добавляли свежую питательную среду (контроль) либо свежую питательную среду с ЭФР в конечной концентрации 10<sup>-8</sup> М (опыт).

Количество ДНК в ядрах определяли в стартовой точке (0 мин), а в дальнейшем — через каждые 30 мин на протяжении 4 ч в фиксированных жидкостью Карнуа и окрашенных по Фельгену препаратах методом абсорбционной цитофотометрии с использованием ядерных зондов разного размера (Шемарова и др., 2002). Данные представлены в виде среднearифметических значений, вычисленных по результатам измерения содержания ДНК в 50—100 клетках с обозначением доверительного интервала  $\bar{x} \pm s_x$ . Достоверность различия средних оценивали по критерию Стьюдента.

В работе использовали неорганические соли производства «Вектон» (Санкт-Петербург) и реактивы фирмы Sigma (США): ингибитор фосфолипазы С — соединение U 73122 (1 мкМ), ингибитор протеинкиназы С — хелеритрин (25 мкМ).

ЭФР был любезно предоставлен сотрудниками Института цитологии РАН.

## Результаты и обсуждение

Действие KCl и KCl в сочетании с ЭФР. Исследовали влияние KCl в концентрациях 50 и 500 мМ на индукцию синтеза ДНК у *T. pyriformis* — как стимулированных, так и не стимулированных ЭФР — и выявляли его митогенный эффект путем окрашивания ДНК в ядрах. В результате проведенных экспериментов установлено, что KCl, применявшийся в конечной концентрации 50 мМ, токсичен для клеток. 30-минутная преинкубация тетрахимен с этим веществом приводила к массовой гибели клеток (60—80 %) уже в 1-е мин после воздействия. Увеличения синтеза ДНК в выживших клетках не наблюдалось (данные не показаны).

При использовании KCl в конечной концентрации 50 мМ также отмечали гибель клеток, но она носила не массовый характер (10—15 %). Интересно, что в данном случае, как и при применении KCl в концентрации на порядок большей, увеличения синтеза ДНК в выживших клетках не наблюдалось. Более того, оно существенно (почти вдвое) снижалось. При этом содержание ДНК в опытных клетках тетрахимен оставалось ниже среднего содержания ДНК в контрольных клетках на протяжении всего срока наблюдения (см. таблицу). Сходная картина отмечена и в отношении опытных, преинкубированных с KCl клеток, растущих в среде с ЭФР (см. таблицу). Полученные данные могут указывать на деление опытных клеток после индукции пролиферации СПС и задержку их в фазе G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> клеточного цикла.

С явлением преждевременного деления стимулированных ЭФР клеток *T. pyriformis* мы уже сталкивались при изучении совместного действия ЭФР и инсулина (Шемарова и др., 2002). По-видимому, снижение относительного содержания ДНК в преинкубируемых с KCl клетках на начальных сроках культивирования в СПС объясняется amitotическим делением клеток с одиначным содержанием ДНК, а возможно, и делением той части клеточной популяции, которая вступила в цикл в фазе G<sub>2</sub>/M. Чтобы прояснить этот вопрос, требуется использование более совершенных методов синхронизации клеточной культуры. Примененный же в нашей работе наиболее щадящий физиологический метод синхронизации (путем переноса клеток в свежую питательную среду) не

позволяет на этапе активации пролиферации получить однородную клеточную популяцию в фазе  $G_1$  клеточного цикла, что в некоторой степени затрудняет интерпретацию полученных результатов (Шемарова и др., 2002).

Самым низким относительное содержание ДНК в опытных клетках (стимулированных и не стимулированных ЭФР) было на сроке 1.5 ч и составило 79.19 и 57.29 % от контроля соответственно, что может говорить об ингибирующем влиянии КС1 на синтез ДНК у тетрахимен. Как видно из представленных в таблице данных, присутствие в среде ЭФР оказывалось недостаточным для обеспечения прогрессии клеточного цикла. К окончанию срока наблюдения в опытных клетках отмечалось незначительное увеличение синтеза ДНК (см. таблицу), которое не превышало величины, характерной для гаплоидных клеток, находящихся в пререпликативном периоде клеточного цикла. Возможно, низкое содержание ДНК на протяжении всего опытного периода в клетках тетрахимен, преобразованных КС1, обусловлено их переходом из фазы  $G_1$  клеточного цикла в фазу  $G_0$ , т. е. в состояние пролиферативного покоя, характерное для клеток, подвергнутых стрессу (для большинства представителей протистов и многоклеточных систем), или для терминально дифференцированных клеток позвоночных. В этом состоянии клетки, как и в фазе  $G_1$  клеточного цикла, содержат одинарное количество ДНК (Елифанова и др., 1988).

Полученные результаты оказались для нас неожиданными. Из данных литературы известно, что в клетках млекопитающих КС1 вызывает деполяризацию мембраны, а смещение мембранного потенциала в отрицательную сторону инициирует открытие  $Ca^{2+}$ -каналов плазматической мембраны, следствием чего является повышение  $[Ca^{2+}]_i$ , являющееся важным индуктором многих клеточных процессов, в том числе и пролиферации (Verridge, 1995; Adachi-Akahane, 2005). К повышению  $[Ca^{2+}]_i$  приводит и стимуляция рецепторов факторов роста лигандами (Авдонин, Ткачук, 1994). Имеются сведения о том, что в основе механизма влияния локального кальциевого сигнала (повышения  $[Ca^{2+}]_i$ ) на пролиферацию лежит активация  $Ca^{2+}$ -зависимых протеинкиназ митогенного MAP-киназного каскада (Neo et al., 2006; Lee et al., 2006). Сходный механизм активации MAP-киназ выявлен и в клетках низших эукариот (на примере *Toxoplasma gondii*; Roisin et al., 2000). Опираясь на эти данные литературы, мы предполагали, что преобработка тетрахимен КС1 приведет к стимуляции пролиферативного роста, а не наоборот. Возможно, объяснить полученные результаты можно тем, что инфузории в отличие от токсоплазм и большинства клеток млекопитающих, активируемых факторами роста, обладают потенциалуправляемыми  $Ca^{2+}$ -каналами, а следовательно, и механизмами диссипации кальциевого сигнала путем гиперполяризации ПМ (за счет удаления  $K^+$  из клетки через активацию  $Ca^{2+}$ -активируемых  $K^+$ -каналов, отсутствующих в невозбудимых клетках и у большинства протистов) (Saimi, Martinac, 1989). Гиперполяризацию ПМ могут вызвать и концентрации КС1, значительно превышающие пороговый физиологический уровень (в данном эксперименте 500 мМ КС1), а, как известно, гиперполяризация мембраны приводит к клеточным ответам, противоположным тем, которые индуцируются деполяризацией, в данном случае — к задержке клеточного роста и апоптозу (Lang et al., 2007).

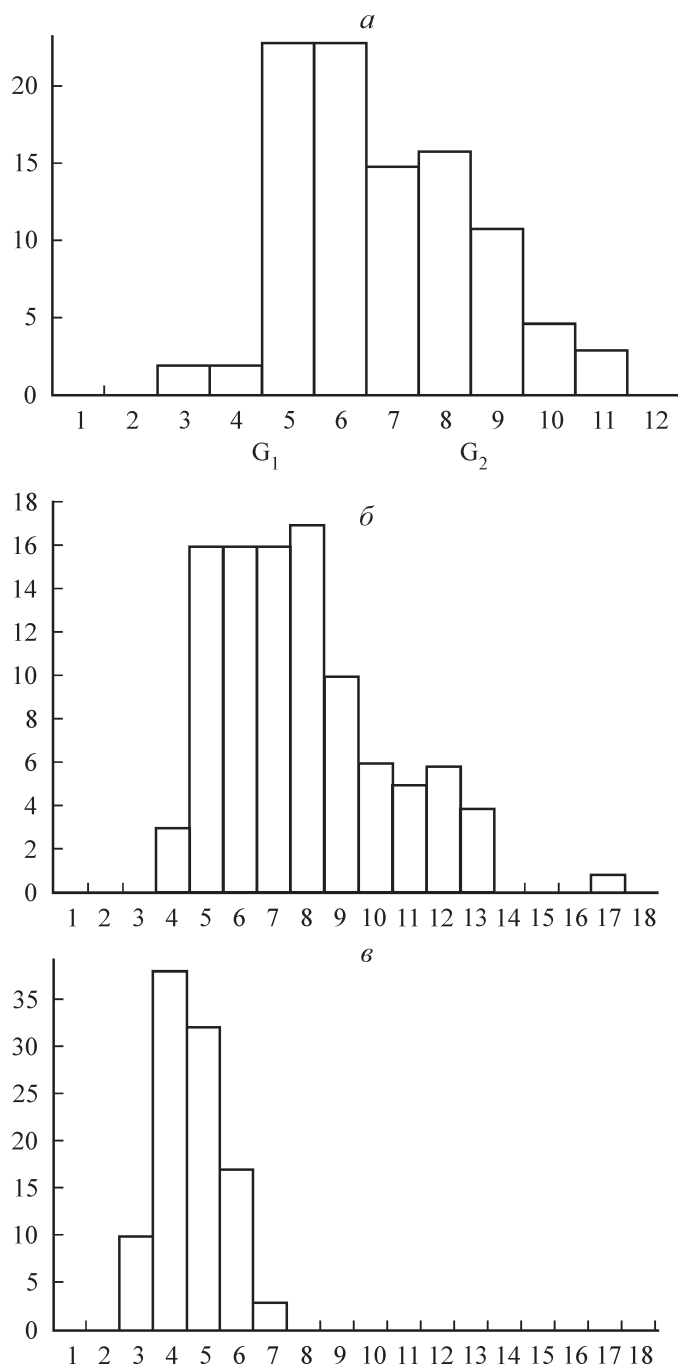
Действие ингибиторов PLC и PKC. В экспериментах следующей серии мы оценивали вклад в мито-

генную передачу сигналов PLC и PKC — ключевых ферментов PI-пути. Нам представлялось важным выяснить, влияет ли их блокада на передачу пролиферативных сигналов у тетрахимен. С этой целью в среду культивирования инфузорий добавляли соединения U 73122 и хелеритрин в конечных концентрациях 1 и 25 мкМ соответственно. 30-минутная преинкубация инфузорий с блокаторами PLC и PKC приводила к резкому уменьшению среднего количества ДНК в ядрах опытных клеток по сравнению с клетками, растущими в присутствии ЭФР без добавления блокаторов. Эта разница становилась заметной уже через 30 мин после начала эксперимента (см. таблицу) и составляла в среднем 48.49 и 30.30 % соответственно. На протяжении всего срока наблюдения в опытных клетках не происходило сколь-либо заметного увеличения синтеза ДНК. Через 4 ч инкубации содержание ДНК в опытных клетках оставалось примерно таким же, как и в начале эксперимента (см. таблицу).

Уменьшение содержания ДНК в ядрах тетрахимен, обработанных ингибиторами PLC и PKC, мы объясняем причинами, на которые указывали при обсуждении экспериментов по воздействию КС1. Очевидно, что в разделившихся клетках после воздействия ингибиторов нарушен процесс синтеза ДНК и присутствие в среде ЭФР не приводит к прогрессии клеточного цикла. Возможно, такие клетки, как и клетки, обработанные КС1, блокируются на границе фаз  $G_1/G_0$ . Таким образом, полученные данные могут указывать на важную роль PLC и PKC в жизнедеятельности тетрахимен. Блокирование этих ферментов вызывает преждевременное деление клеток и тем самым задерживает их развитие и рост.

Проблема передачи сигналов по PI-пути с участием PLC и PKC у протистов весьма актуальна. Напомним, что лишь в последнее время появились работы, свидетельствующие о существовании у низших эукариот PI-пути, сходного с таковым у высших эукариот (Shemarova, 2007). Долгое время считалось, что PLC и PKC имеются только у Metazoa, а изоформы, выявляемые у протистов, не участвуют в сигнальной трансдукции. К настоящему времени поколебать сложившиеся представления удалось многим исследователям, в частности протистологам, на примере тетрахимен показавшим, что ингибирование как PLC, так и PKC может привести к массовой гибели клеток (Christensen et al., 1998; Rasmussen, Rasmussen, 2000). В своих экспериментах мы также отмечали гибель клеток сразу после воздействия ингибиторов (на 15—18 % по сравнению с контролем), что объясняли цитотоксичностью этих соединений для тетрахимен. Однако нельзя исключать и возможности того, что в случае подавления активности PLC и PKC применявшимися ингибиторами активируются другие классы родственных ферментов, перекрывающих передачу сигнала с митогенного пути на апоптогенный.

Действие кофеина. В данных экспериментах мы изучали действие 10 мМ кофеина на клетки, стимулированные и не стимулированные ЭФР. Результат экспериментов оказался несколько неожиданным, так как, вопреки нашим прогнозам, кофеин блокировал пролиферацию стимулированных ЭФР клеток и в то же время оказывал ростстимулирующее действие на клетки, растущие без ЭФР. Через 4 ч инкубации относительное содержание ДНК в стимулированных ЭФР клетках составило 59.35 % по сравнению с контролем, в нестимулированных — 137.79 %. Из данных гистограммы распределение клеток по количеству ДНК на этом сроке видно, что доля клеток,



Гистограмма распределения клеток *Tetrahymena pyriformis* по содержанию ДНК после преобработки кофеином и кофеином в сочетании с ЭФР.

*а* — клетки без преинкубации с кофеином (контроль); СПС без ЭФР. *б* — клетки, преинкубированные в течение 30 мин с кофеином (10 мМ); СПС без ЭФР. *в* — клетки, преинкубированные в течение 30 мин с кофеином (10 мМ); СПС с ЭФР. По горизонтали — содержание ДНК (отн. ед.) в клетках *T. pyriformis* через 4 ч после переноса в свежую питательную среду; по вертикали — доля клеток, %.

характеризующихся «одинарным» пресинтетическим количеством ДНК и соответственно находящимся в G<sub>1</sub>-периоде клеточного цикла в стимулированных ЭФР опытных культурах тетрахимен, была значительно выше, чем в контрольных культурах и опытных культурах без стимуляции ЭФР (см. рисунок). Доля клеток, синтезирующих

ДНК и обладающих промежуточным количеством ДНК, также была выше в опытных стимулированных ЭФР клетках тетрахимен (см. рисунок, в). В то же время доля клеток, характеризующихся удвоенным, постсинтетическим количеством ДНК, находящихся в G<sub>2</sub>-периоде клеточного цикла, в опытных стимулированных ЭФР клетках (см. рисунок, в) была значительно ниже, чем таковая в контрольных клетках (см. рисунок, а) и опытных клетках без стимуляции ЭФР (см. рисунок, б). Эти данные могут свидетельствовать о том, что в присутствии ЭФР кофеин задерживает рост клеток, возможно путем блока их на границе фаз G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> клеточного цикла, в то время как при самостоятельном использовании кофеин, напротив, ускоряет продвижение клеток по циклу и тем самым увеличивает их пролиферативную активность. Полученные результаты оказались для нас неожиданными. Опираясь на данные литературы, свидетельствующие о том, что гормоны и факторы роста стимулируют освобождение внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> и тем самым участвуют в формировании локального кальциевого сигнала (Capiod et al., 2007; Roderick, Cook, 2008), мы предполагали, что кофеин, являясь активатором кальциевых каналов внутриклеточных Ca<sup>2+</sup>-депо, усилит величину Ca<sup>2+</sup>-сигнала и вследствие этого вызовет усиление клеточного ответа — пролиферацию. Однако ожидаемые результаты в эксперименте не подтвердились. Отсутствие прогрессии клеточного цикла опытных клеток, стимулированных ЭФР, может свидетельствовать по крайней мере о двух вещах: во-первых, о том, что у тетрахимен отсутствуют кофеин-чувствительные кальциевые каналы, и, во-вторых, о том, что активация кофеин-чувствительных кальциевых каналов на фоне повышенной [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> приводит к задержке клеточного цикла (принцип отрицательной обратной связи).

Надо сказать, что кофеин-чувствительные кальциевые каналы — достаточно редкая разновидность кальциевых каналов, они обнаружены в поперечнополосатых мышцах и сердце (Endo, 1977; Zhang et al., 2007), в гладкомышечных клетках (Saida, van Breemen, 1983; Kanaide et al., 1987) и в ряде клеток немышечного происхождения: нейронах (Schoppe et al., 2003), секреторных (Osipchuk et al., 1990; Lara et al., 1997) и некоторых других (Galione et al., 1991; Shoshan-Barmatz et al., 2005). Имеются указания на то, что каналы, активируемые кофеином и подобные риадиноновым рецепторам млекопитающих, имеются у одноклеточной водоросли *Cryptosporidium cohnii*. Эти каналы активируются механическим стрессом и участвуют в мобилизации внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> (Yeung et al., 2006).

Данные нашего эксперимента с использованием клеток, преинкубированных с кофеином, дают основание предположить, что такие каналы имеются и у тетрахимен. На это могут указывать как повышенное по сравнению с контролем среднее содержание ДНК в фазу синтеза ДНК, так и ускоренный характер продвижения опытных клеток по клеточному циклу. Если исходить из того, что в основе митогенстимулирующего действия кофеина лежит Ca<sup>2+</sup>-зависимый механизм, цепь событий, происходящих под действием кофеина, можно представить следующим образом. Кофеин активирует одноименные кальциевые каналы внутриклеточных Ca<sup>2+</sup>-депо, из депо происходит выброс Ca<sup>2+</sup>, который формирует фронт (кальциевую волну), распространяющуюся вглубь клетки и попутно активирующую Ca<sup>2+</sup>-зависимые первоначально цитоплазматические, а затем ядерные регуляторные белки. Для такой гипотезы есть основание, так как в цитоплазме некоторых

протистов обнаружен природный эндогенный лиганд, активирующий кофеин-чувствительные каналы в физиологических условиях (Masuda et al., 1997; Chini et al., 2005). Таким лигандом является циклическая аденозиндифосфатрибоза, которая образуется из НАД<sup>+</sup>, а ферменты, катализирующие ее синтез, обнаружены в различных клетках, в том числе и в клетках низших эукариот (Guse, 2002).

Однако исходя из предположения об активирующем действии кофеина на Ca<sup>2+</sup>-каналы у тетрахимен не следует исключать и возможность его плейотропного действия, в том числе и на генетический аппарат клетки. Имеются данные о нарушении кофеином репликации ДНК, что приводит к появлению aberrантных клеток, вступающих в G<sub>1</sub>-фазу клеточного цикла с удвоенным количеством ДНК. Возможно, увеличение относительного содержания ДНК в клетках тетрахимен, преинкубированных с кофеином, можно объяснить, руководствуясь данной точкой зрения. Дальнейшие эксперименты помогут прояснить этот вопрос.

Таким образом, на основании полученных результатов и литературных данных представляется возможным предположить, что в клетках инфузорий *T. pyriformis* митогенный сигнальный путь носит Ca<sup>2+</sup>-зависимый характер. В структуру этого пути входят кальциевые каналы ПМ, ключевые ферменты PI-пути — PLC и PKC, а также кофеин-чувствительные Ca<sup>2+</sup>-каналы внутриклеточных Ca<sup>2+</sup>-депо.

Авторы выражают глубокую признательность Е. Б. Буровой, Н. Д. Медведевой и К. В. Соболю за любезно предоставленные вещества — ЭФР, U 73122 и хеллеритрин, без которых выполнение данной работы было бы невозможно.

### Список литературы

- Авдонин П. В., Ткачук В. А. 1994. Рецепторы и внутриклеточный кальций. М.: Наука.
- Елифанова О. И., Полуновский В. А., Терских В. В. 1988. Регуляция размножения клеток в процессе специализации, старения и неопластической трансформации. М.: ВИНТИ. Итоги науки и техники. 11 : 120 с.
- Ирлина И. С., Меркулова Н. А. 1975. Выращивание больших масс *Tetrahymena pyriformis*, пригодных для биохимических исследований и синхронизация делений инфузорий. Цитология. 17 : 1208—1215.
- Шемарова И. В., Селиванова Г. В., Власова Т. Д. 2002. Влияние эпидермального фактора роста и инсулина на пролиферацию и синтез ДНК в клетках цилиат *Tetrahymena pyriformis*. Цитология. 44 (1) : 1097—1103.
- Adachi-Akahane S. 2005. Pharmacological basis of Ca<sup>2+</sup> channels and channel antagonists. Clin. Calcium. 15 : 1589—1597.
- Alam S., Banno Y., Nozawa Y. 1993. Purification and characterization of phospholipase C preferentially hydrolysing phosphatidylcholine in *Tetrahymena* membranes. J. Eukaryot. Microbiol. 40 : 775—781.
- Avdonin P. V., Hayes B. A., Pozin E. Y., Popov E. G., Gavrilov I. Y., Tkachuk V. A., Ryan U. S. 1989. Dual-phase response of bovine pulmonary artery endothelial cells to agonists which increase free cytoplasmic calcium concentration. Tissue and Cell. 21 : 171—178.
- Berridge M. J. 1995. Calcium signalling and cell proliferation. Bioessays. 17 : 491—500.
- Boonstra J., Rijken P., Humbel B., Cremers F., Verkleij A., van Bergen en Henegouwen P. 1995. The epidermal growth factors. Cell Biol. Int. 19 : 413—430.
- Capiod T., Shuba Y., Skryma R., Prevarskaya N. 2007. Calcium signalling and cancer cell growth. Subcell. Biochem. 45 : 405—427.
- Chini E. N., Nagamune K., Wetzel D. M., Sibley L. D. 2005. Evidence that the cADPR signalling pathway controls calcium-mediated microneme secretion in *Toxoplasma gondii*. Biochem. J. 389 : 269—277.
- Christensen S. T., Chemnitz J., Straarup E. M., Kristiansen K., Wheatley D. N., Rasmussen L. 1998. Staurosporine-induced cell death in *Tetrahymena thermophila* has mixed characteristics of both apoptotic and autophagic degeneration. Cell Biol. Int. 22 : 591—598.
- Endo M. 1977. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. Physiol. Rev. 57 : 71—108.
- Galione A., Lee H. C., Busa W. B. 1991. Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in sea urchin egg homogenates: modulation by cyclic ADP-ribose. Science. 253 : 1143—1146.
- Guse A. H. 2002. Cyclic ADP-ribose (cADPR) and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP): novel regulators of Ca<sup>2+</sup>-signaling and cell function. Curr. Mol. Med. 2 : 273—282.
- Heo J. S., Lee Y. J., Han H. J. 2006. EGF stimulates proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of Ca<sup>2+</sup> influx and p44/42 MAPKs. Amer. J. Physiol. Cell Physiol. 290 : C123—C133.
- Kanaide H., Shogakiuchi Y., Nakamura M. 1987. The norepinephrine-sensitive Ca<sup>2+</sup>-storage site differs from the caffeine-sensitive site in vascular smooth muscle of the rat aorta. FEBS Lett. 214 : 130—134.
- Lang F., Föllmer M., Lang P., Ritter M., Vereninov A., Szabo I., Huber S. M., Gulbins E. 2007. Cell volume regulatory ion channel in cell proliferation and cell death. Methods Enzymol. 428 : 209—225.
- Lara B., López M. G., Villarroya M., Gandia L., Cleeman L., Morad M., Garcia A. G. 1997. A caffeine-sensitive Ca<sup>2+</sup> store modulates K<sup>+</sup>-evoked secretion in chromaffin cells. Amer. J. Physiol. 272 : C1211—C1221.
- Lee M. Y., Lee S. H., Kim Y. H., Heo J. S., Park S. H., Lee J. H., Han H. J. 2006. Effect of EGF on [3H]-thymidine incorporation and cell cycle regulatory proteins in primary cultured chicken hepatocytes: involvement of Ca<sup>2+</sup>/PKC and MAPKs. J. Cell. Biochem. 99 : 1677—1687.
- Masuda W., Takenaka S., Tsuyama S., Tokunaga M., Yamaji R., Inui H., Miyatake K., Nakano Y. 1997. Inositol 1,4,5-trisphosphate and cyclic ADP-ribose mobilize Ca<sup>2+</sup> in a protist, *Euglena gracilis*. Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 118 : 279—283.
- Osipchuk Y. V., Wakui M., Yule D. I., Gallacher D. V., Petersen O. H. 1990. Cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> oscillations evoked by receptor stimulation, G-protein activation, internal application of inositol trisphosphate or Ca<sup>2+</sup>: simultaneous microfluorimetry and Ca<sup>2+</sup> dependent Cl<sup>-</sup> current recording in single pancreatic acinar cells. EMBO J. 9 : 697—704.
- Pai R., Tarnawski A. 1998. Signal transduction cascades triggered by EGF receptor activation: relevance to gastric injury repair and ulcer healing. Dig. Dis. Sci. 43 : 14S—22S.
- Rasmussen M., Rasmussen L. 2000. Phospholipase C and D in the commitment to survival; or death in the early lag phase of *Tetrahymena* cultures. Cell Biochem. Funct. 18 : 133—139.
- Roderick H. L., Cook S. J. 2008. Ca<sup>2+</sup> signalling checkpoints in cancer: remodelling for cancer cell proliferation and survival. Nat. Rev. Cancer. 8 : 361—375.
- Roisin M. P., Robert-Gagneux F., Creuzet C., Dupouy-Camet J. 2000. Biochemical characterization of mitogen-activated protein (MAP) kinase activity in *Toxoplasma gondii*. Parasitol. Res. 86 : 588—598.
- Saida K., van Breemen C. 1983. A possible Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release mechanism mediated by norepinephrine in vascular smooth muscle. Pflugers Arch. 397 : 166—167.
- Saimi Y., Martinac B. 1989. Calcium-dependent potassium channel in *Paramecium* studied under patch clamp. J. Membr. Biol. 112 : 79—89.

Schoppe J., Dierkes P. W., Hochstrate P., Schlue W. R. 2003. NTP, the photoproduct of nifedipine, activates caffeine-sensitive ion channels in leech neurons. *Cell Calcium*. 33 : 207—221.

Shemarova I. V. 2007. Phosphoinositide signaling in unicellular eukaryotes. *Crit. Rev. Microbiol.* 33 : 141—156.

Shoshan-Barmatz V., Orr I., Martin C., Vardi N. 2005. Novel ryanodine-binding properties in mammalian retina. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37 : 1681—1695.

Strobl J. S., Wonderlin W. F., Flynn D. C. 1995. Mitogenic signal transduction in human breast cancer cells. *Gen. Pharmacol.* 26 : 1643—1649.

Yeung P. K., Lam C. M., Ma Z. Y., Wong Y. H., Wong J. T. 2006. Involvement of calcium mobilization from caffeine-sensitive stores in mechanically induced cell cycle arrest in the dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii*. *Cell Calcium*. 39 : 259—274.

Zhang Y. A., Tuft R. A., Lifshitz L. M., Fogarty K. E., Singer J. J., Zou H. 2007. Caffeine-activated large-conductance plasma membrane cation channels in cardiac myocytes: characteristics and significance. *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293 : H2448—H2461.

Поступила 26 III 2008

CHANGES IN THE DNA CONTENT IN EGF-STIMULATED CILIATE *TETRAHYMENA PYRIFORMIS*  
UNDER EFFECT OF CAFFEINE, KCL, AND INHIBITORS OF PLC AND PKC

I. V. Shemarova,<sup>1</sup> G. V. Selivanova,<sup>2</sup> T. D. Vlasova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS  
and <sup>2</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;  
e-mail: irina@lis.mail.iephb.ru

It has been established that DNA content in ciliata *Tetrahymena pyriformis* changes under effect of the caffeine, and PLC and PKC inhibitors (U 73122 and chelerythrine accordingly). 10 mM caffeine stimulated DNA synthesis in these cells, 1  $\mu$ M U 73122 and 25  $\mu$ M chelerythrine, on the contrary, blockades the synthesis. 50 and 500 mM KCl, the agent which causes depolarization of plasma membrane stimulating Ca<sup>2+</sup> entry into the cells, has no effect. The transduction of the proliferative signals in *T. pyriformis* cells has been proposed to be of Ca<sup>2+</sup>-dependent nature.

Key words: *Tetrahymena pyriformis*, intracellular signaling, proliferation, EGF, caffeine, Ca<sup>2+</sup>, PLC and PKC.