

## РЕОРГАНИЗАЦИЯ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА В КЛЕТКАХ 3Т3-SV40 И ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРНЫХ КЛЕТОК

© Н. А. Филатова, К. М. Кирпичникова, И. А. Гамалей<sup>1</sup>

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; <sup>1</sup> электронный адрес: igamaley@mail.cytspb.rssi.ru

В настоящей работе мы выясняли, влияет ли организация актинового цитоскелета трансформированных клеток 3Т3-SV40 на их чувствительность к действию естественных киллерных клеток (ЕКК). Исследовали влияние антиоксиданта N-ацетилцистеина (НАС) и деполимеризатора актина латрункулина В на оба параметра клеток. Из экспериментов по действию антиоксиданта НАС на клетки следует, что чувствительность клеток к литическому действию ЕКК сохраняется при разобранных микрофиламентах, но исчезает при появлении хорошо выраженных актиновых структур. Однако чем более разрушены микрофиламенты в присутствии латрункулина, тем меньше (противоположно действию НАС) чувствительность клеток 3Т3-SV40 к литическому действию ЕКК. Эти данные говорят об отсутствии прямой зависимости отношений между клетками 3Т3-SV40 и ЕКК от целостности структур микрофиламентов, что подтверждает сделанный нами ранее вывод (Gamaley et al., 2006). Уменьшение чувствительности клеток к действию ЕКК параллельно с изменением структур актинового цитоскелета в результате действия как латрункулина, так и НАС свидетельствует об изменении поверхности клеток, в результате чего инактивируются (или исчезают) молекулы, служащие активирующим сигналом для ЕКК.

Ключевые слова: актиновый цитоскелет, естественные киллеры, латрункулин В, трансформированные фибробласты 3Т3-SV40, цитотоксический индекс, N-ацетилцистеин.

В предыдущих работах мы показали, что N-ацетилцистеин (НАС), предшественник синтеза глутатиона в клетке, может модифицировать актиновый цитоскелет в нормальных и трансформированных фибробластах. Мы обнаружили, что спустя 1 сут после действия антиоксиданта трансформированные фибробласты 3Т3-SV40 временно приобретают морфологические черты нормальных клеток («псевдонормальный фенотип»), т. е. хорошо организованные актиновые структуры, свойственные нормальным клеткам 3Т3, но отсутствующие у трансформированных клеток 3Т3-SV40 (Ефремова и др., 2004; Гамалей и др., 2006). Параллельно с приобретением стресс-фибрилл клетки приобретают и некоторые функциональные черты нормальных клеток, а именно не инвазируются бактериями (Гамалей и др., 2006; Gamaley et al., 2006) и не узнаются естественными киллерными клетками (ЕКК) (Филатова и др., 2006), как и нормальные клетки 3Т3. Эти эффекты ставят вопрос о роли организации (реорганизации) актинового цитоскелета клеток-мишеней (3Т3-SV40) в их взаимодействии с клетками-эффекторами (ЕКК).

ЕКК — это несенсибилизированные большие гранулярные лимфоциты, характеризующиеся цитолитической активностью против широкого спектра клеток-мишеней — опухолевых, зараженных вирусами и некоторых нормальных. Природа структур, которые ЕКК распознают на клетках-мишенях, до сих пор неясна. Данные из литературы говорят об обязательном участии ряда белков цитоскелета ЕКК (актина, миозина и тубулина) в их взаимодействии с клетками-мишенями и в реализации механизма литического действия эффекторов (Radosević et al.,

1994, 1995; Malorni et al., 2003; Stebbins et al., 2003; Gismondi et al., 2004). Но лишь в единичных работах предполагается значение структур цитоскелета клеток-мишеней для их взаимодействия с ЕКК (Radosević et al., 1994).

В настоящей работе, используя разработанную нами экспериментальную модель, мы попытались выяснить, влияет ли организация активного цитоскелета трансформированных клеток 3Т3-SV40 на их чувствительность к литическому действию ЕКК или обнаруженная нами корреляция между этими показателями (Филатова и др., 2006) лишь сопутствует тем изменениям (но не влияет на них), которые вызывает действие антиоксиданта. Для этого мы вызывали реорганизацию (деполимеризацию) актинового цитоскелета в клетках 3Т3-SV40 с помощью латрункулина В и выясняли, как при этом меняется чувствительность клеток к литическому действию ЕКК. Действие латрункулина В сравнивали с действием НАС. Латрункулин — это класс соединений, выделяемых из морских губок *Latrunculia magnifica*, которые деполимеризуют актин, разрушая микрофиламенты и изменяя морфологию клетки, но не влияют при этом на структуру микротрубочек (Spector et al., 1983, 1989; El Sayed et al., 2006).

### Материал и методика

Клетками-мишенями служили эмбриональные мышечные фибробласты линии Valb/3Т3 (клетки 3Т3), трансформированные вирусом SV40 (клетки 3Т3-SV40). Параллельно ряд экспериментов проводили и на клетках

ЗТЗ. Клетки получены из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН. Клетки культивировали в среде ДМЕМ с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки до образования монослоя. Деполимеризатор актина латрункулин В или NAC (Sigma, США) вводили в среду культивирования клеток до необходимой концентрации на 2 (латрункулин В) или 2—24 (NAC) ч. Затем среду заменяли на свежую, не содержащую агента, и продолжали культивировать клетки еще 24 ч. Латрункулин В использовали в концентрациях от 200 нМ до 1 мкМ, NAC — от 0.2 до 10 мМ.

Клетки-эффекторы (ЕКК) выделяли из селезенки интактных мышей-самцов линии СЗНА, массой 18—20 г, полученных из питомника «Рапполово» РАН. Из селезенки готовили клеточные суспензии, освобожденные от эритроцитов с помощью осмотического шока по описанной ранее методике (Малыгин, Апреликова, 1982), и подсчитывали в камере Горяева количество ядро-содержащих клеток — спленоцитов.

Естественную киллерную активность спленоцитов (клеток-эффекторов) оценивали с помощью <sup>3</sup>H-уридинового цитотоксического теста (Hashimoto, Sudo, 1971) в модификации Рыковой с сотрудниками (1981). Клетки-мишени метили <sup>3</sup>H-уридином (Радиевый институт, Москва), добавляя его в среду одновременно с латрункулином или NAC, после чего клетки отмывали от остатков <sup>3</sup>H-уридина и латрункулина. Соотношение эффекторов и мишеней составляло 20 : 1. Уровень естественной киллерной активности оценивали с помощью цитотоксического индекса (ЦИ), отражающего долю погибших клеток-мишеней в %. Цитотоксическую активность ЕКК определяли в отсутствие латрункулина или NAC.

Для визуализации актиновых элементов цитоскелета клетки отмывали от среды фосфатно-солевым буферным раствором, фиксировали 3.7%-ным раствором формалина в течение 10 мин, обрабатывали 0.1%-ным раствором Тритона X-100 в течение 10 мин и окрашивали родамин-фаллоидином (Sigma, США) в течение 15 мин при 37 °С. Микроскопирование полученных препаратов производили на микроскопе Axioscop, возбуждая и регистрируя флуоресценцию светом с длинами волн соответственно 540 и 590 нм. Использовали объектив 100× и окуляр 15×.

Изменения структур актинового цитоскелета и чувствительности клеток-мишеней к действию ЕКК оценивали сразу после действия латрункулина В или NAC и через 20—24 ч после удаления агента из среды культивирования. После всех опытов жизнеспособность клеток оценивали по их способности окрашиваться трипановым синим.

## Результаты

На рис. 1, б показана структура актинового цитоскелета клеток ЗТЗ-SV40. Видно, что эти клетки, как и другие трансформированные клетки, не имеют столь отчетливо выраженных стресс-фибрилл, которые характерны для нормальных фибробластов (например, ЗТЗ) и клеток других типов. Присутствие в среде культивирования в течение 2 ч латрункулина В вызывает постепенную разборку актинового цитоскелета и изменение формы клеток. Эффект минимален при концентрации латрункулина 200 нМ и максимален при концентрации 1 мкМ, при которой микрофиламенты практически полностью разбирают-

Таблица 1

### Естественная киллерная активность спленоцитов мышей СЗНА по отношению к клеткам ЗТЗ-SV40, обработанным в течение 2 ч латрункулином В (ЛВ)

Концентрация ЛВ, нМ	ЦИ, %, $\bar{x} \pm s_x$	
	через 2 ч действия	через 24 ч после отмывки от ЛВ
0 (контроль)	26.6 ± 1.5	
200	15.5 ± 1.7	20.5 ± 2.4
500	5.0 ± 2.3	11.5 ± 2.6
1000	2.3 ± 0.9	7.0 ± 1.9
0 (контроль) для ЗТЗbalb	2.2 ± 0.6	

Примечание. Здесь и в табл. 2 соотношение клеток-эффекторов и клеток-мишеней 20 : 1. Для каждого случая даны средние значения цитотоксического индекса (ЦИ) из 12—30 измерений в трех экспериментах. Значения ЦИ для нормальных клеток ЗТЗ (табл. 1) даны для сравнения.

ся, сами клетки округляются; на микрофотографиях видны скопления аморфного актина (рис. 1, а, в, д). Степень изменений в разных клетках может быть различной, но совокупность наблюдений позволяет утверждать, что большая часть клеток претерпевает изменения, показанные на рис. 1. В концентрации меньше 200 нМ латрункулин В не вызывает видимых изменений формы клеток и организации актинового цитоскелета (не иллюстрируется). Действие агента обратимо. После удаления латрункулина из среды микрофиламенты восстанавливаются, причем, как и в случае с антиоксидантом NAC (Ефремова и др., 2004; Gamaley et al., 2006), в процессе восстановления клетки морфологически отличаются от контрольных и приобретают утолщенные и хорошо выраженные стресс-фибриллы (рис. 1, з, е).

Далее оказалось, что влиянию латрункулина В подвержена и чувствительность клеток ЗТЗ-SV40 к литическому действию ЕКК. Она уменьшается с увеличением концентрации агента (табл. 1), и это происходит параллельно с разборкой актиновых структур. После действия латрункулина в концентрации 1 мкМ чувствительность клеток к действию ЕКК практически исчезает и величина их ЦИ уменьшается до 2.3 % (против 26.6 % в контроле). У нечувствительных к действию ЕКК нормальных фибробластов ЗТЗ величина ЦИ колеблется в пределах 0—5 % (Филатова и др., 2006). Через 1 сут после удаления латрункулина заменой среды чувствительность клеток к ЕКК возвращается, причем тем быстрее, чем меньше была концентрация агента. Однако через 1 сут после 2-часового действия 1 мкМ латрункулина, когда стресс-фибриллы уже восстановились, чувствительность клеток-мишеней к ЕКК остается все еще на очень низком уровне, незначительно отличающемся от нормальных клеток ЗТЗ (табл. 1). Эксперименты с удалением латрункулина показывают, что восстановление разрушенного цитоскелета (рис. 1, з, е) происходит гораздо быстрее, чем восстановление исходной чувствительности клеток к действию ЕКК (табл. 1).

Исследуя ранее влияние NAC на чувствительность клеток ЗТЗ-SV40 к литическому действию ЕКК, мы ограничились одной концентрацией NAC (10 мМ) и одним сроком его действия (24 ч) (Филатова и др., 2006). Выбор был продиктован исследованиями влияния этого антиок-

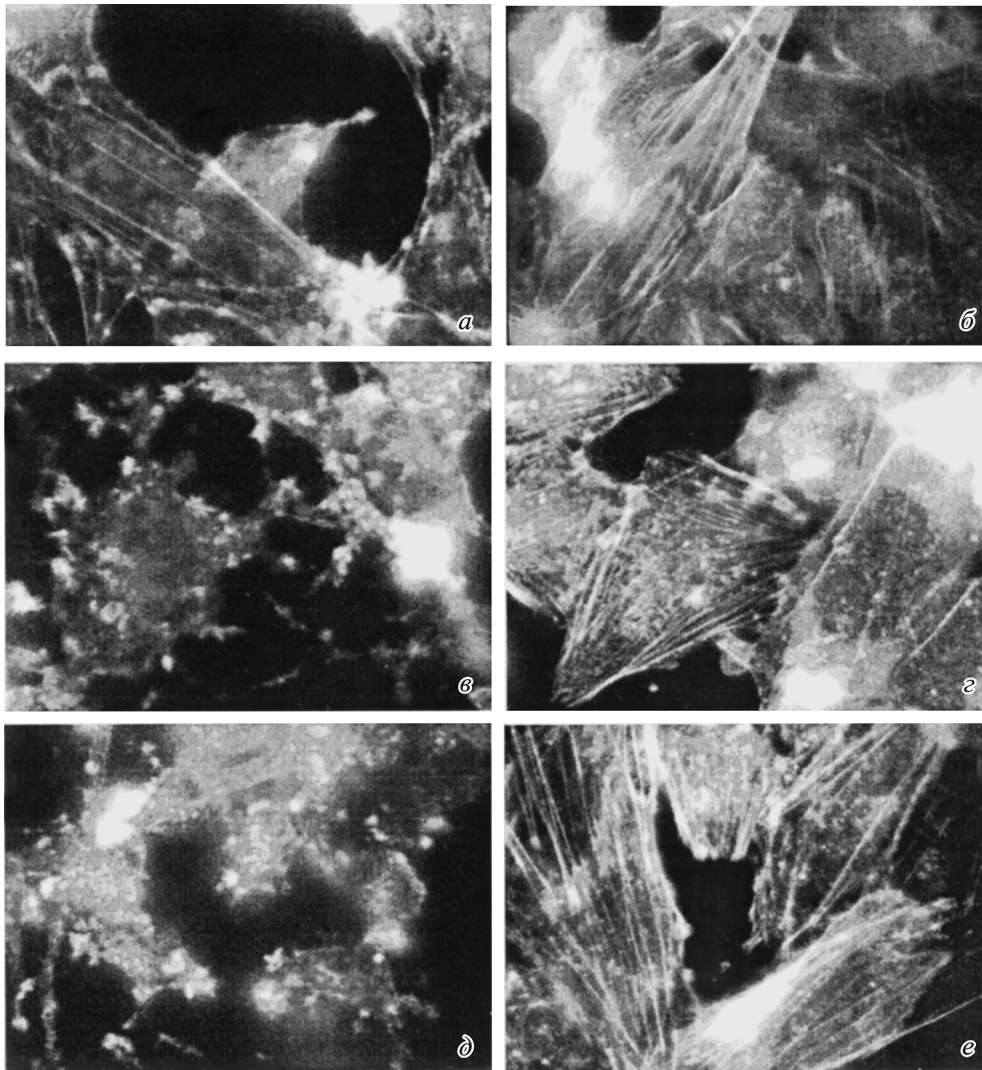


Рис. 1. Изменения актинового цитоскелета мышечных фибробластов 3T3-SV40 после введения в среду культивирования (б, в, д) и последующего удаления из нее (з, е) латрункулина В.

а, в, д — через 2 ч действия латрункулина В в концентрации соответственно 200, 500 нМ или 1 мкМ; б — контроль; з, е — через 24 ч после удаления из среды латрункулина В в концентрации 500 нМ или 1 мкМ соответственно. Здесь и на рис. 2 представлены флуоресцентные микрофотографии актина, окрашенного родамином—фаллоидином. Об. Н1 100×.

сиданта именно в такой концентрации на различные показатели активности клеток 3T3-SV40 — пролиферацию (Гамалей и др., 2003), содержание активных форм кислорода и восстановленного глутатиона и чувствительность клеток к бактериальной инвазии (Гамалей и др., 2006; Gamalety et al., 2006). Для корректного сравнения влияния NAC и латрункулина на зависимость чувствительности клеток к действию ЕКК от реорганизации актинового цитоскелета в настоящей работе мы проверили влияние NAC в меньших концентрациях и при разном времени его действия на клетки. Уменьшение концентрации NAC до 2 мМ значительно уменьшает степень разрушения актиновых структур в большей части клеток, и они (как и форма клеток) почти не отличаются от контрольных (рис. 2). Однако через 24 ч после удаления NAC клетки имеют хорошо выраженные стресс-фибриллы (рис. 2, в). Это говорит о том, что дезорганизация микрофиламентов в присутствии NAC и появление хорошо выраженных актиновых структур в клетках 3T3-SV40 после обработки их NAC — процессы, между собой прямо не связанные.

Как зависит от концентрации NAC чувствительность клеток к действию ЕКК? Само присутствие NAC независимо от концентрации (0.2—10 мМ) и времени (2—24 ч) практически не меняет чувствительности клеток 3T3-SV40 к действию ЕКК. Их ЦИ остается в пределах 30 %. Однако степень уменьшения чувствительности клеток к литическому действию ЕКК через 24 ч после удаления антиоксиданта зависит не столько от его концентрации, сколько от времени предварительного действия NAC. Так, уменьшение концентрации NAC от 10 до 2 мМ ничего не меняет: через 24 ч после удаления антиоксиданта из среды по-прежнему возникает устойчивость клеток 3T3-SV40 к ЕКК и их ЦИ равен 4 % (против 29 % в контроле). Только самая низкая из испытанных концентраций NAC — 0.2 мМ — не меняет чувствительности клеток к действию ЕКК в тех же экспериментальных условиях.

На рис. 3 показано, как зависит от времени действия NAC (2—20 ч) последующая чувствительность клеток к действию ЕКК. Видно, что потеря чувствительности клеток тем больше, чем дольше было его действие. При

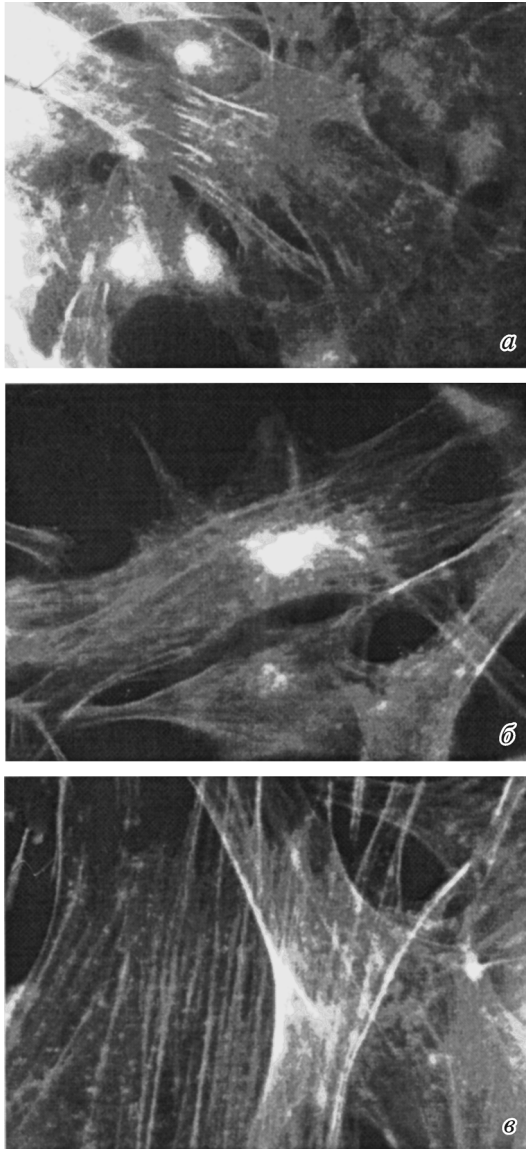


Рис. 2. Изменения актинового цитоскелета мышинных фибробластов 3Т3-SV40, окрашенного после введения в среду культивирования (б) и последующего удаления из нее (в) N-ацетилцистеина (NAC) в концентрации 2 мМ.

а — контроль, б — через 20 ч действия NAC, в — через 24 ч после удаления из среды NAC.

действию NAC не происходит быстрой перестройки актинового цитоскелета, как это наблюдается при действии латрункулина или, например, цитохалазина D (не иллюстрируется); заметная реорганизация цитоскелета в клетках 3Т3-SV40 начинается через 5 ч действия антиоксиданта (Ефремова и др., 2004).

Чтобы понять, насколько важна именно восстанавливающая активность NAC на поверхности клетки, мы сравнили его действие с действием плохо проникающего в клетки глутатиона, предшественником которого в клетке является NAC. Испытывали действие восстановленного (GSH) и окисленного (GSSG) глутатиона. Действие GSH на актиновый цитоскелет в клетках 3Т3-SV40 подобно действию NAC (Ефремова и др., 2004). Что касается изменения чувствительности клеток к действию ЕКК, то показано, что GSH (10 мМ) меняет ее так же, как и NAC, и в

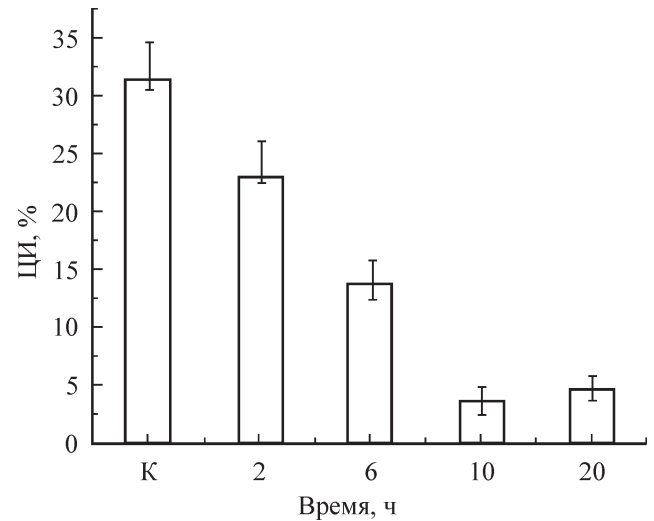


Рис. 3. Чувствительность фибробластов 3Т3-SV40 к литической активности естественных киллерных клеток (ЕКК) в зависимости от времени предварительной обработки 10 мМ NAC.

Фибробласты культивировали в присутствии NAC в течение 2—20 ч, после чего среду заменяли на свежую, не содержащую NAC, и через 24 ч оценивали устойчивость клеток (ЦИ) к ЕКК. ЦИ — цитотоксический индекс, К — контроль.

Таблица 2

**Естественная киллерная активность спленоцитов мышей СЗНА по отношению к клеткам 3Т3-SV40, обработанным восстановленным (GSH) или окисленным (GSSG) глутатионом**

Агент, 10 мМ	ЦИ, %, $\bar{x} \pm s_x$	
	через 20 ч действия	через 24 ч после отмывки
0 (контроль)	34.1 ± 3.0	
GSH	35.8 ± 3.4	4.1 ± 1.3
GSSG <sup>а</sup>	33.3 ± 3.2	35.8 ± 2.8
NAC <sup>б</sup>	29.2 ± 3.0	3.9 ± 1.2

<sup>а</sup> Окисленный глутатион. <sup>б</sup> Приводится для сравнения.

той же концентрации, а GSSG никакого влияния на этот параметр клеток не оказывает (табл. 2).

Итак, сопоставление результатов действия латрункулина В на актиновый цитоскелет в клетках 3Т3-SV40 (рис. 1) позволяет сделать заключение о том, что чем более разрушены микрофиламенты, тем меньше чувствительность клеток 3Т3-SV40 к литическому действию ЕКК. Из данных по действию антиоксиданта NAC на микрофиламенты этих же клеток следует противоположный вывод: чувствительность клеток к литическому действию ЕКК сохраняется при разобранных микрофиламентах, но исчезает при появлении хорошо выраженных актиновых структур. Эти выводы говорят, скорее, об отсутствии прямых отношений между целостностью структур микрофиламентов в присутствии NAC или после его удаления и чувствительностью клеток 3Т3-SV40 к ЕКК.

## Обсуждение

Итак, мы сравнивали действие антиоксиданта NAC и деполимеризатора актина латрункулина В на трансформированные клетки 3T3-SV40, пытаясь понять, связаны ли прямо функциональные изменения клеток при действии NAC (т. е. потеря ими чувствительности к литической активности ЕКК) с организацией актинового цитоскелета в клетках. Сопоставление изменений организации актиновых структур в клетках и их чувствительности к ЕКК при действии латрункулина В говорит о быстром (в течение 2 ч) разрушающем актиновые микрофиламенты действии агента и параллельном уменьшении и даже исчезновении (в зависимости от концентрации агента) чувствительности клеток к ЕКК. Однако восстановление цитоскелета после действия агента по времени опережает восстановление чувствительности к ЕКК.

Анализ зависимости тех же параметров клеток от концентрации и времени действия NAC говорит о более многоступенчатом действии этого агента по сравнению с латрункулином В. Дезорганизация актиновых филаментов при действии NAC (или GSH) не влияет на чувствительность клеток к ЕКК. Отсроченные во времени функциональные изменения клеток, обработанных NAC, их независимость от дезорганизации актинового цитоскелета говорят о том, что изменение функциональной активности клеток 3T3-SV40 после предварительной обработки их антиоксидантом связано с какими-то молекулярными событиями, требующими длительного времени для реализации на функциональном уровне. Изменение организации актина в клетках при действии и после действия NAC, по-видимому, лишь дополняет цепь молекулярных изменений, вызванных его действием.

Сопоставление картин изменения актинового цитоскелета после действий латрункулина и NAC (в процессе отмычки) показывает некоторое сходство их действия, а именно: дезорганизованный столь разными агентами актиновый цитоскелет на пути возврата к исходному состоянию приобретает временно черты нормальных клеток — отчетливо выраженные микрофиламенты, отсутствующие у контрольных клеток. Зависит ли этот факт от природы агента, дезорганизующего актиновые филаменты, или от свойств самих актиновых филаментов, сказать сейчас нельзя. Можно предположить, что мишенью действия NAC все-таки может быть внутриклеточный актин, поскольку он имеет остатки метионина (Milzani et al., 2000) и Cys-374 (Dalle-Donne et al., 1999), доступные окислению (и восстановлению). Но по всей вероятности, актин не является первой мишенью действия NAC, хотя он и участвует в тех молекулярных изменениях, которые в конечном итоге приводят к потере трансформированными клетками чувствительности к литической активности ЕКК.

Антиоксидант NAC, являясь источником сульфгидрильных групп, сдвигает окислительно-восстановительный баланс клетки в сторону антиоксидантов, главным образом восстановленного глутатиона — основного восстанавливающего компонента клетки (Spolarics, Wu, 1997; см. обзор: Zaffarulah et al., 2003). Изменения содержания глутатиона регистрируются не ранее чем через 4 ч, что, возможно, и объясняет время наступления дезорганизации актинового цитоскелета в клетках, но не объясняет изменения физиологической активности клеток, которое происходит тогда, когда содержание глутатиона уже вернулось к контрольному значению (Gamaley et al., 2006). Кроме изменения внутриклеточного редокс-балан-

са и зависимой от него активности ряда сигнальных белков (Zaffarulah et al., 2003) NAC (как и GSH) может с самого начала своего действия восстанавливать доступные ему молекулы прямо на поверхности клетки и молекулы внеклеточного матрикса, что ведет к дальнейшим молекулярным перестройкам и изменению функциональной активности клетки. В пользу такой возможности свидетельствует отсутствие аналогичных изменений при действии GSSG. Необходимость длительного действия NAC для потери клетками чувствительности к действию ЕКК (рис. 3) говорит о том, что действие NAC может еще и индуцировать синтез и появление на поверхности клеток молекул белка, отсутствующих у контрольных клеток.

Что касается латрункулина В, то какие-либо мишени его действия в клетке, кроме актиновых структур, из данных литературы нам неизвестны (Spector et al., 1983, 1989; Yarmola et al., 2000; El Sayed et al., 2006).

По современным представлениям, основой узнавания ЕКК клеткой-мишенью является наличие специальных рецепторов у ЕКК (общее название — рецепторы естественной цитотоксичности), для которых на поверхности клеточной мембраны имеются лиганды различного типа (см. обзоры: Moretta, Moretta, 2004; Takeda, Okumura, 2004). Наличие таких молекул является сигналом к инактивации (ингибированию) литической активности ЕК. Процесс клеточной трансформации или вирусной инфекции приводят к утрате или недостаточной экспрессии этих лигандов, что делает клетку-мишень доступной для взаимодействия с ЕКК и последующего лизиса (Long, Rajagopalan, 2002; Moretta, Moretta, 2004). При образовании контакта (иммунного синапса) между клеткой-мишенью и ЕКК происходит реорганизация поверхности ЕКК с обязательным участием белков цитоскелета ЕКК (Radosević et al., 1994, 1995; Malorni et al., 2003; Stebbins et al., 2003; Gismonti et al., 2004). Это позволяет предполагать и наличие соответствующих молекул на поверхности клеточной мембраны, участвующих в образовании контакта с ЕКК. Такими молекулами могут быть адгезионные молекулы, принадлежащие к семейству интегринов и участвующие в образовании контакта (иммунного синапса) между клеткой-мишенью и ЕКК (Malorni et al., 1993; Gabriel, Kindermann, 1998; Montoya et al., 2002; Poggi, Zocchi, 2006). Нарушение молекулярной структуры и плотности этого контакта может быть причиной изменения литической активности ЕКК. В обзорной работе Зубовой и Окулова (2001) высказано предположение о том, что адгезионные контакты служат для макрофагов (клеток первой линии иммунной защиты) своеобразным кодом, на основании которого они распознают чужеродные и трансформированные клетки. Внутриклеточные сигналы, возникающие при изменении адгезии клеток, могут быть причиной изменения чувствительности клеток к апоптозу (Bharadwaj et al., 2004; Valentijn et al., 2004). Предполагается, что ключевыми сигнальными молекулами в этом случае могут быть актинсвязывающие белки, в частности тропомиозин, от которого зависит дезорганизация (стабилизация) актинового цитоскелета (Bharadwaj et al., 2004).

Структурные изменения актина или актинсвязывающие белки моделируют клеточную поверхность с ее рецепторами, взаимодействия с внеклеточным матриксом и межклеточные взаимодействия. Изменение характера адгезионных контактов ЕКК с поверхностью клетки-мишени может быть причиной изменения киллерной активности эффекторов. Способность латрункулина В и NAC

(столь разных по механизму действия) уменьшать чувствительность клеток к действию ЕКК, с одной стороны, подтверждает ту неясность, которая существует в литературе относительно лигандов узнавания ЕКК на поверхности клеток-мишеней и связи их со структурами цитоскелета (Radosević et al., 1994; Poggi, Zocchi, 2006), а с другой — свидетельствует об инактивации (или исчезновении) молекул, являющихся активирующим сигналом для ЕКК. Поиск таких молекул — наша дальнейшая задача.

Авторы благодарны С. Ю. Хайтлиной за участие в обсуждении работы и Е. А. Вахромовой за помощь в ее оформлении.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-48586) и частичной финансовой поддержке проекта «Ведущие научные школы» (НШ-523.2006.4).

### Список литературы

- Гамалей И. А., Аксенов Н. Д., Ефремова Т. Н., Кирпичникова К. М. 2003. Влияние агентов, изменяющих внутриклеточный уровень активных форм кислорода, на характер распределения клеток линий 3Т3 и 3Т3-SV40 по фазам клеточного цикла. Цитология. 45 (1) : 26—33.
- Гамалей И. А., Ефремова Т. Н., Кирпичникова К. М., Комиссарчик Я. Ю., Кевер Л. В., Полозов Ю. С., Хайтлина С. Ю. 2006. Уменьшение чувствительности трансформированных клеток 3Т3-SV40, обработанных N-ацетилцистеином, к бактериальной инвазии. Бюл. эксперим. биол. мед. 142 (7) : 101—105.
- Ефремова Т. Н., Кирпичникова К. М., Хайтлина С. Ю., Гамалей И. А. 2004. Перестройки актинового цитоскелета в клетках 3Т3 и 3Т3-SV40 в присутствии антиоксидантов. Цитология. 46 (5) : 395—403.
- Зубова С. Г., Окулов В. Б. 2001. Роль молекул адгезии в процессе распознавания чужеродных и трансформированных клеток макрофагами млекопитающих. Успехи соврем. биол. 121 (1) : 56—59.
- Малыгин А. М., Апреликова О. Н. 1982. Естественная противоопухольевая активность спленоцитов мышей СЗНА. Эксперим. онкол. 4 (3) : 37—39.
- Рыкова М. П., Спиранде И. В., Зедгендзе М. С., Ляхов В. В., Фукс Б. Б. 1981. Новая высокочувствительная техника тестирования нормальных киллеров. Иммунология. 1 : 88—90.
- Филатова Н. А., Кирпичникова К. М., Гамалей И. А. 2006. Уменьшение активности естественных киллеров по отношению к трансформированным фибробластам 3Т3-SV40, обработанным N-ацетилцистеином. Цитология. 48 (5) : 438—442.
- Bharadwaj S., Hitchcock-DeGregori S., Thorburn A., Prasad G. L. 2004. N terminus is essential for tropomyosin functions: N-terminal modification disrupts stress fiber organization and abolishes anti-oncogenic effects of tropomyosin-1. J. Biol. Chem. 279 : 14 039—14 048.
- DalleDonne I., Milzani A., Colombo R. 1999. The tert-butyl hydroperoxide-induced oxidation of actin Cys-374 is coupled with structural changes in distant regions of the protein. Biochemistry. 38 : 12 471—12 480.
- El Sayed K. A., Youssef D. T., Marchetti D. 2006. Bioactive natural and semisynthetic latrunculin. J. Nat. Prod. 69 : 219—223.
- Gabriel H. H., Kindermann W. 1998. Adhesion molecules during immune response to exercise. Can. J. Physiol. Pharmacol. 76 : 512—523.
- Gamaley I., Efremova T., Kirpichnikova K., Komissarchik Y., Polozov Yu., Khaitlina S. 2006. N-acetylcysteine-induced changes in susceptibility of transformed eukaryotic cells to bacterial invasion. Cell Biol. Int. 30 : 319—325.
- Gismondi A., Cifaldi L., Mazza C., Giliani S., Parolini S., Morrone S., Jacobelli J., Bandiera E., Notarangelo L., Santoni A. 2004. Impaired natural and CD16-mediated NK cell cytotoxicity in patients with WAS and XLT: ability of IL-2 to correct NK cell functional defect. Blood. 104 : 436—443.
- Hashimoto Y., Sudo H. 1971. Evaluation of cell damage in immune reactions by release of radioactivity from <sup>3</sup>H-uridine labeled cells. Gann. 62 : 139—145.
- Long E. O., Rajagopalan S. 2002. Stress signals activate natural killer cells. J. Exp. Med. 196 : 1399—1402.
- Malorni W., Iosi F., Zarccone D., Grossi C. E., Arancia G. 1993. Role of adhesion molecules in the mechanism of non-MHC (major histocompatibility complex) restricted cell-mediated cytotoxicity. Scanning Microsc. 7 : 323—331.
- Malorni W., Quaranta M. G., Straface E., Falzano L., Fabbri A., Viora M., Fiorentini C. 2003. The Rac-activating toxin cytotoxic necrotizing factor 1 overrules NK cell-mediated activity by regulating the actin/microtubule interplay. J. Immunol. 171 : 4195—4202.
- Milzani A., Rossi R., Di Simplicio P. 2000. The oxidation produced by hydrogen peroxide on Ca-ATP-G-actin. Protein Sci. 9 : 1774—1782.
- Montoya M. C., Sancho D., Vicente-Manzanares M., Sánchez-Madrid F. 2002. Cell adhesion and polarity during immune interaction. Immunol. Rev. 186 : 68—82.
- Moretta L., Moretta A. 2004. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. EMBO J. 23 : 255—259.
- Poggi A., Zocchi M. R. 2006. Mechanisms of tumor escape: role of tumor microenvironment in inducing apoptosis of cytolytic effector cells. Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.). 54 : 323—333.
- Radosević K., van Leeuwen M. T., Segers-Nolten I. M., Figdor C. C., de Grooth B. G., Greve J. 1994. Changes in actin organization during the cytotoxic process. Cytometry. 15 : 320—326.
- Radosević K., van Leeuwen M. T., Segers-Nolten I. M., Figdor C. C., de Grooth B. G., Greve J. 1995. Occurrence and a possible mechanism of penetration of natural killer cells into K562 target cells during the cytotoxic interaction. Cytometry. 20 : 273—280.
- Spector I., Shochet N. R., Blasberger D., Kashman Y. 1989. Latrunculins — novel marine macrolides that disrupt microfilaments organization and affect cell growth. I. Comparison with cytochalasin D. Cell Motil. Cytoskeleton. 13 : 127—144.
- Spector I., Shochet N. R., Kashman Y., Groweiss A. 1983. Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. Science. 219 : 493—495.
- Spolarics Z., Wu J. X. 1997. Role of glutathione and catalase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification in LPS-activated hepatic endothelial and Kupffer cells. Amer. J. Physiol. 273 : G1304—G1311.
- Stebbins C. C., Watzl C., Billadeau D. D., Leibson P. J., Burshtyn D. N., Long E. O. 2003. Vav1 dephosphorylation by the tyrosine phosphatase SHP-1 as a mechanism for inhibitor of cellular cytotoxicity. Mol. Cell. Biol. 17 : 6291—6299.
- Takeda K., Okumura K. 2004. CAM and NK cells. eCAM. 1 : 17—27.
- Velentijn A. J., Zouq N., Gailmore A. P. 2004. Anoikis. Biochem. Soc. Trans. 32 : 421—425.
- Yarmola E. G., Somasundaram T., Boring T. A., Spector I., Bubb M. R. 2000. Differential modulation of actin-binding protein function by latrunculin A. J. Biol. Chem. 275 : 28 120—28 127.
- Zafarullah M., Li W. Q., Sylvester J., Ahmad M. 2003. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. CMLS Cell Mol. Life Sci. 60 : 6—20.

REORGANIZATION OF ACTIN CYTOSKELETON IN 3T3-SV40 CELLS  
AND THEIR SENSITIVITY TO LYSIS BY NATURAL KILLER CELLS*N. A. Filatova, K. M. Kirpichnikova, I. A. Gamaley<sup>1</sup>*

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

<sup>1</sup> e-mail: igamaley@mail.cytspb.rssi.ru

The present work was aimed to examine whether the actin reorganization of 3T3-SV40 cells influences their sensitivity to natural killer (NK) cells activity. The effects of N-acetylcystein (NAC) and latrunculin B, actin depolymerizator, on both cellular parameters were studied. Experiments with NAC demonstrated that 3T3-SV40 sensitivity to NK cells activity remained unchanged under the disordered microfilaments but decreased upon the appearance of structured stress-fibres. The data on latrunculin B action resulted in the opposite conclusion: the more microfilaments disorganization in the presence of latrunculin B the lesser 3T3-SV40 sensitivity to lysis by NK cells. These facts suggest that relations between microfilament integrity in 3T3-SV40 cells and their sensitivity to NK cells are rather independent. The latter confirms our previous conclusion (Gamaley et al., 2006). Decrease in 3T3-SV40 sensitivity to NK cells activity accompanied by actin reorganization resulted from both latrunculin B and NAC action suggests changes in cellular surface, which ultimately lead to inactivation (or loss) of the molecules being activating signals to NK cells.

**Key words:** actin cytoskeleton, cytotoxicity index, latrunculin B, N-acetylcysteine, natural killers, transformed fibroblasts 3T3-SV40.

---