

ИНГИБИРОВАНИЕ КОЛХИЦИНОМ И ВИНБЛАСТИНОМ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНОЙ СИСТЕМЫ ИНФУЗОРИИ *DILEPTUS ANSER*

© К. В. Деркач,¹ А. О. Шпаков,¹ З. И. Успенская,² Л. А. Кузнецова¹

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: alex_shpakov@list.ru

Цитоскелет играет важную роль в функционировании гормональных сигнальных систем у позвоночных животных. Однако данные в отношении влияния компонентов цитоскелета, в частности микротрубочек, на функциональную активность хемосигнальных систем одноклеточных организмов в настоящее время отсутствуют. Цель работы состояла в изучении влияния разрушающих микротрубочки агентов — колхицина и винбластин — на аденилатциклазную систему свободноживущих инфузорий *Dileptus anser*. Инкубация *D. anser* с колхицином и винбластином (10^{-5} — 10^{-6} М) слабо влияла на базальную активность аденилатциклазы (АЦ), но приводила к значительному снижению или полному блокированию стимуляции АЦ негормональными (GppNHp, фторид натрия) и гормональными (адреналин, серотонин, глюкагон) агентами. При этом снижался базальный уровень ГТФ-связывания гетеротримерных G-белков и наблюдалось ингибирование стимуляции G-белков гормонами. Показано, что колхицин и винбластин прерывают стимуляцию АЦ адреналином, осуществляемую через G_s-белок, но слабо влияют на его ингибирующий АЦ эффект, реализуемый через G_i-белок. Таким образом, впервые установлено, что у одноклеточных организмов — инфузорий *D. anser* — микротрубочки вовлечены в регуляцию функциональной активности АЦ-системы, а их действие реализуется на уровне G-белков, сходных с G_s-белками позвоночных животных.

Ключевые слова: аденилатциклаза, винбластин, гетеротримерный G-белок, ГТФ-связывание, инфузория *Dileptus anser*, колхицин, микротрубочки, цитоскелет.

В клетках позвоночных животных сигнальные белки, компоненты гормональных сигнальных систем, тесно ассоциированы с цитоскелетом, играющим важную роль в процессе передачи гормонального сигнала в клетку. Имеются многочисленные свидетельства в пользу взаимодействия с микротрубочками и микрофиламентами гетеротримерных ГТФ-связывающих белков (G-белков) и фермента аденилатциклазы (АЦ), компонентов гормональночувствительной аденилатциклазной системы (АЦ-системы) (Zog, 1983; Wolff, Cook, 1985; Wang et al., 1990; Ibarondo et al., 1995; Cote et al., 1997; Dave et al., 2009). Обработка клеток колхицином и винбластином, которые препятствуют формированию микротрубочек, а также цитохалазином В, который разрушает микрофиламенты, приводит к изменению интенсивности передачи гормонального сигнала через АЦ-систему. При этом отчетливо меняются, усиливаются или, напротив, ослабляются, стимулирующие эффекты гормонов на АЦ-систему, реализуемые через G-белки стимулирующего типа (G_s-белки) (Rudolph et al., 1977; Haggmann, Fishman, 1980; Feuilleley et al., 1988; Cote et al., 1997; Nishigaki et al., 1998), в то время как эффекты гормонов, ингибиторов АЦ, реализуемые с участием G-белков ингибирующего типа (G_i-белков), меняются незначительно или сохраняются (Jasper et al., 1995). Это связано с тем, что микротрубочки и микрофиламенты влияют в основном на функциональную активность G_s-белков и очень слабо взаимодействуют с

другими типами G-белков (Cote et al., 1997; Head et al., 2006).

Цитоскелет участвует в реализации важнейших клеточных процессов не только у позвоночных животных, но и у одноклеточных организмов, в том числе у инфузорий и жгутиконосцев (Ono, Nakabayashi, 1987; Hamilton et al., 1988; Schultz et al., 1997; Fujii, Numata, 1999; Kovacs, Csaba, 2006). Обнаружено, что у инфузории *Tetrahymena pyriformis* цитостатики не только блокируют митотический цикл, но и подавляют рост и двигательную активность инфузорий, нарушают формирование пищевой вакуоли (Kovacs, Csaba, 2006). Однако данные о влиянии агентов, разрушающих элементы цитоскелета, на функциональную активность хемосигнальных систем одноклеточных эукариот, от которых зависит протекание многих жизненно важных процессов у этих организмов, в настоящее время отсутствуют.

Целью работы было изучение влияния цитостатиков на базальную активность АЦ-системы свободноживущей инфузории *Dileptus anser* и на ее стимуляцию негормональными и гормональными агентами. В качестве ингибиторов митоза были выбраны колхицин и винбластин, которые разрушают микротрубочки, но не действуют на другие элементы цитоскелета клетки. Колхицин связывается с тубулином и образует с ним прочный комплекс, который затем вводится в концы микротрубочек и препятствует их полимеризации (Margolis, Wilson, 1977).

Винбластин в концентрации 10^{-6} — 10^{-5} М осуществляет деполимеризацию микротрубочек и нарушает взаимодействие между ними (Owellen et al., 1976). Выбор АЦ-системы *D. anser* был обусловлен тем, что ее функциональные свойства и регуляция гормонами позвоночных животных (пептидными гормонами, биогенными аминами) были изучены нами ранее (Деркач и др., 2002; Шпаков и др., 2003, 2004, 2007).

Материал и методика

В опытах использовали инфузорий *D. anser*, которых культивировали в солевой среде Prescott при 25 °С (кормом для них служили инфузории *T. pyriformis*). Плотность культур составляла 140—150 клеток в 1 мл. Клетки *D. anser* получали из массовой культуры одного клона инфузорий объемом до 3—4 л. Их осаждали центрифугированием (600 g, 3 мин), трижды отмывали 20 мМ буферным раствором Tris-HCl (рН 7.5), ресуспендировали в концентрации $5 \cdot 10^5$ кл./мл и использовали для экспериментов. Гомогенат клеток инфузорий для определения активности АЦ получали растиранием клеток в ручном гомогенизаторе (60—70 ударов). Количество разрушенных клеток составляло не менее 95 % от их общего количества.

В экспериментах *in vivo* инкубацию клеток, ресуспендированных в среде Prescott, с колхицином и винбластином (10^{-7} — 10^{-5} М) проводили в течение 40 мин при комнатной температуре, а затем из них получали гомогенат, в котором измеряли активность АЦ. В экспериментах *in vitro* инкубацию гомогената клеток с цитостатиками проводили в течение 20 мин при 30 °С.

Для опытов использовали следующие реактивы: колхицин, винбластин, адреналин, серотонин, глюкагон, цАМФ, ГТФ, β , γ -имидогуанозин-5'-трифосфат (GppNHp), АТФ, креатинфосфат, креатинфосфокиназа из мышц кролика (НФ 2.7.3.2), имидазол, ЭДТА, ДТТ, кофеин, бычий сывороточный альбумин, Tris-ОН и Lubrol-PX (Sigma, США). Для колоночной хроматографии использовали нейтральную окись алюминия II по Брокману (Sigma, США), для фильтрации — нитроцеллюлозные фильтры тип НА 0.45 мкм (Millipore, США). Для радиоизотопных экспериментов использовали [α - 32 P]АТФ (1.11 ТБк/ммоль)

и β , γ -имидо[8- 3 H]-гуанозин-5'-трифосфат ([8- 3 H]GppNHp) (185 ГБк/ммоль) (Amersham, Англия).

Определение активности аденилатциклазы (АТФ-пирофосфатлиаза циклизирующая, НФ 4.6.1.1) проводили, как описано ранее (Шпаков и др., 2002). Активность АЦ выражали в пмоль цАМФ за 1 мин на 1 мг белка. Определение ГТФ-связывания G-белков проводили, как описано ранее (Shpakov et al., 2006). Специфическое ГТФ-связывание определяли как разность между связыванием меченого [8- 3 H]GppNHp в пробе в отсутствие ГТФ и таковым в присутствии 10 мМ ГТФ. Специфическое ГТФ-связывание выражали в пмоль [8- 3 H]GppNHp на 1 мг белка.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием компьютерной программы ANOVA. Каждый эксперимент был выполнен трехкратно. Данные нескольких независимых экспериментов представлены в виде средней арифметической и ее ошибки. Различия между пробами оценивали по *t*-критерию Стьюдента ($P < 0.05$).

Результаты

Инкубация клеток *D. anser* с колхицином и винбластином (10^{-5} М, 40 мин, 25 °С) приводила к незначительному снижению базальной активности АЦ. В контроле она составляла 1795 ± 65 , в то время как после обработки колхицином и винбластином — 1675 ± 80 и 1695 ± 55 пмоль цАМФ за 1 мин на мг белка соответственно. Оба ингибитора практически не влияли на активацию фермента форсколином (10^{-5} М), стимулирующий эффект которого в контроле составлял 49 %. Как известно, форсколин непосредственно взаимодействует с каталитическим сайтом АЦ. Отсутствие влияния колхицина и винбластина на АЦ-эффект форсколина свидетельствует в пользу того, что молекула фермента не является мишенью действия этих ингибиторов.

В концентрациях 10^{-6} и 10^{-5} М ингибиторы митоза в значительной степени снижали или даже полностью блокировали стимулирующие АЦ эффекты активаторов G-белков — фторида натрия (10^{-2} М) и GppNHp (10^{-5} М), негидролиземого аналога ГТФ, которые в их отсутствие составляли 137 и 51 % соответственно (рис. 1). В концен-

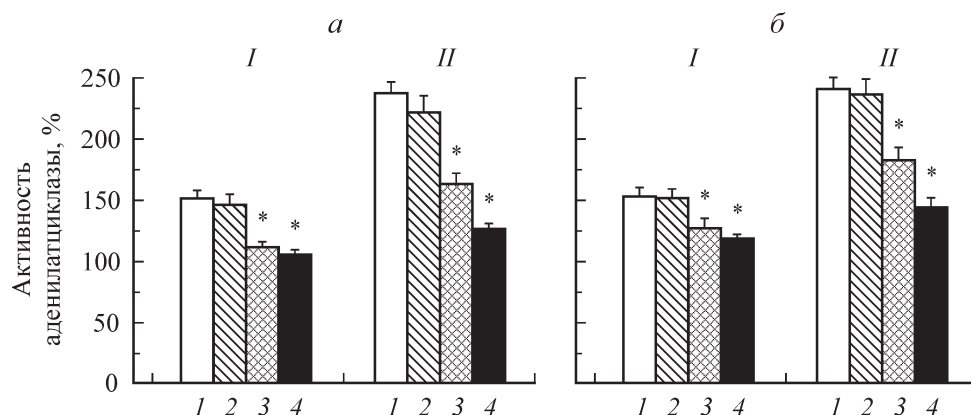


Рис. 1. Влияние инкубации инфузорий *Dileptus anser* с колхицином (а) и винбластином (б) на стимулирующие активность аденилатциклазы эффекты GppNHp и фторида натрия.

I — 10^{-5} М GppNHp, II — 10^{-2} М NaF; 1 — контроль; 2—4 — клетки инфузорий, обработанные 10^{-7} , 10^{-6} и 10^{-5} М колхицином (а) или винбластином (б) соответственно. Здесь и далее звездочкой обозначены эффекты гормональных и негормональных агентов на активность аденилатциклазы и ГТФ-связывание, достоверно сниженные после обработки ингибиторами митоза в сравнении с контролем ($p < 0.05$). Базальная активность аденилатциклазы принята за 100 %.

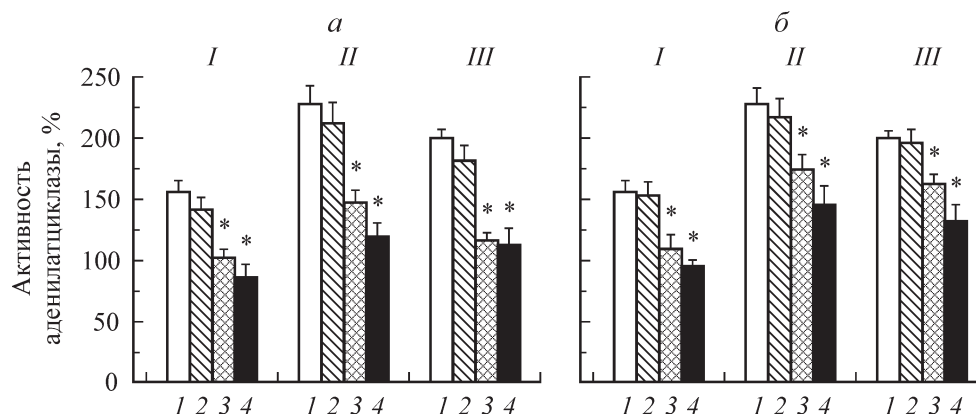


Рис. 2. Влияние инкубации *Dileptus anser* с колхицином (а) и винбластином (б) на стимуляцию аденилатциклазы гормонами. I — 10^{-6} М адреналин, II — 10^{-6} М серотонин, III — 10^{-8} М глюкагон; 1 — контроль, 2—4 — клетки инфузорий, обработанные 10^{-7} , 10^{-6} и 10^{-5} М ингибиторами митоза соответственно. Базальная активность аденилатциклазы принята за 100 %.

трации 10^{-7} М действие обоих ингибиторов не выявлялось. После обработки колхицином и винбластином (10^{-5} М) наблюдалось снижение базального уровня ГТФ-связывания, который является показателем функциональной активности гетеротримерных G-белков. В контроле базальный уровень ГТФ-связывания составлял 0.41 ± 0.03 пмоль [$8\text{-}^3\text{H}$]GppNHp на 1 мг белка, после обработки колхицином и винбластином снижался до 0.25 ± 0.04 и 0.30 ± 0.05 пмоль [$8\text{-}^3\text{H}$]GppNHp на 1 мг белка соответственно. Обнаруженные нами резкое ослабление или даже полное блокирование стимулирующего эффекта NaF и GppNHp на активность АЦ после обработки колхицином и винбластином и снижение базального уровня ГТФ-связывания в этих условиях указывают на то, что вызванное этими ингибиторами нарушение структуры микротрубочек самым непосредственным образом влияет на функциональную активность G_s-белков, стимулирующим способом сопряженных с АЦ.

Стимулирующие АЦ эффекты биогенных аминов адреналина и серотонина (10^{-6} М) и пептидного гормона глюкагона (10^{-8} М) в контроле составляли 59, 132 и 103 %. Эффект глюкагона усиливался (потенцировался) в присутствии GppNHp (10^{-6} М). Потенцирующий эффект, который составлял 33 %, рассчитывали как разность между величиной стимулированной активности фермента при совместном действии глюкагона и GppNHp и величиной арифметической суммы активностей фермента при раздельном действии гормона и гуанинового нуклеотида. Обнаружение потенцирующего эффекта свидетельствует о том, что стимуляция активности АЦ глюкагоном и GppNHp представляет собой кооперативный процесс.

Колхицин и винбластин (10^{-6} — 10^{-5} М) полностью блокировали стимулирующий АЦ эффект адреналина (рис. 2). Они также отчетливо снижали стимулирующие эффекты серотонина и глюкагона, причем колхицин был в этом отношении более эффективным в сравнении с винбластином. После инкубации клеток с ингибиторами митоза полностью исчезал потенцирующий эффект GppNHp на стимуляцию АЦ глюкагоном. Таким образом, разрушение микротрубочек колхицином и винбластином нарушает передачу стимулирующего гормонального сигнала через АЦ-систему инфузории, осуществляемую через G_s-белки.

В контроле адреналин, серотонин и глюкагон отчетливо стимулировали ГТФ-связывание, но после обработ-

ки инфузорий колхицином и винбластином (10^{-5} М) стимулирующие эффекты гормонов на ГТФ-связывание снижались, в наибольшей степени для серотонина и глюкагона — они составляли в среднем 13—24 % от таковых в контроле (рис. 3). В то же время стимулирующий эффект адреналина снижался только до 43—48 % от такового в клетках инфузорий, не подвергшихся действию колхицина и винбластина, что, вероятно, связано с сохранением стимулирующего влияния гормона на G_i-белки.

В пользу этого свидетельствуют наши данные по изучению влияния на G-белки *D. anser* йохимбина, селективного блокатора α_2 -адренорецепторов, которые, как было показано нами ранее, присутствуют у инфузорий и ингибирующим способом сопряжены с АЦ через G_i-белки (Шаповалов и др., 2004). Обнаружено, что и у контрольных инфузорий, и у инфузорий, обработанных колхицином и винбластином, йохимбин ингибирует стимулирующий ГТФ-связывание эффект адреналина. Более того, у обработанных колхицином и винбластином инфузорий йохимбин снижает стимулирующий ГТФ-связывание эффект адреналина на 45—57 %, несмотря на то что этот эффект и так был снижен в два с лишним раза после инкубации с ингибиторами митоза.

На заключительном этапе изучали влияние колхицина и винбластина на функциональную активность АЦ-си-

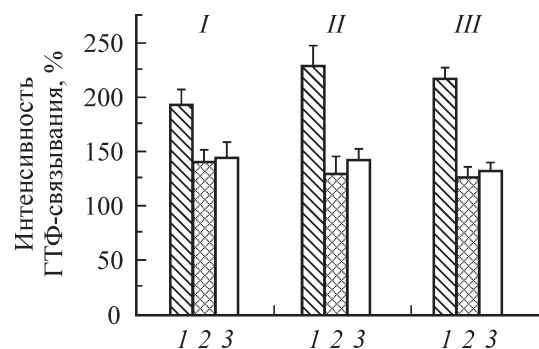


Рис. 3. Снижение стимулирующих эффектов гормонов на ГТФ-связывание G-белков после обработки ингибиторами митоза.

I — 10^{-6} М адреналин, II — 10^{-6} М серотонин, III — 10^{-8} М глюкагон; 1 — контроль, 2, 3 — клетки инфузорий, обработанные 10^{-5} М колхицином и винбластином соответственно. Базальный уровень ГТФ-связывания принят за 100 %.

стемы в гомогенате инфузории *D. anser*. Показано, что инкубация гомогената с ингибиторами митоза даже в сравнительно высоких концентрациях (10^{-5} М) существенно не влияет на базальную активность АЦ и уровень ГТФ-связывания, а также на стимуляцию АЦ-системы гормонами (данные не показаны). Следовательно, ингибирующее действие колхицина и винбластина на АЦ-систему вызвано не прямым воздействием на ее компоненты, а деструкцией элементов цитоскелета клетки *D. anser* в присутствии ингибиторов митоза.

Обсуждение

Микротрубочки, важнейший элемент цитоскелета, ответственны за морфологию клетки и осуществляют регуляцию большинства фундаментальных клеточных процессов, включая деление клетки, ее дифференцировку и движение, внутриклеточный транспорт (Desai, Mitchison, 1997). Функции, которые выполняют микротрубочки в клетке, определяются процессами их полимеризации и деполимеризации. Одним из ключевых молекулярных механизмов, лежащих в основе влияния микротрубочек на клеточные процессы, является их взаимодействие с компонентами гормональных сигнальных систем, в том числе АЦ-системы. При этом микротрубочки, с одной стороны, определяют функциональную активность гормональных сигнальных систем и, с другой, сами являются мишенями регуляторного действия гормонов, активирующих эти системы (Roychowdhury, Rasenick, 2008; Dave et al., 2009). Поскольку микротрубочки определяют функции клетки не только у позвоночных животных, для которых взаимодействие между цитоскелетом и гормональными сигнальными системами изучено достаточно хорошо, но также и у одноклеточных организмов, логично было предположить, что эти элементы цитоскелета регулируют сигнальные каскады и у наиболее примитивных представителей эукариот, в частности у инфузорий. В пользу такого предположения говорят многочисленные свидетельства высокой консервативности структурно-функциональной организации хемосигнальных систем одноклеточных организмов и гормональных сигнальных систем высших эукариот (Шпаков, 2007; Shpakov, Pertseva, 2008).

Нами показано, что ингибиторы митоза колхицин и винбластин, вызывающие разрушение микротрубочек, снижают или даже полностью блокируют функциональную активность АЦ-системы инфузории *D. anser*. Это указывает на то, что у одноклеточных эукариот, так же как и у позвоночных животных, микротрубочки вовлечены в регуляцию цАМФ-зависимых сигнальных каскадов. При этом наблюдались различия во влиянии ингибиторов митоза на регуляцию гормонами АЦ-системы у инфузорий и позвоночных. Если у инфузорий инкубация с колхицином и винбластином вызывает снижение стимулирующих АЦ эффектов гормонов, то у позвоночных животных ингибиторы митоза в большинстве случаев повышают эти эффекты, реализуемые через G_s -белки. Так, обработка колхицином усиливает стимуляцию АЦ гормонами в надпочечниках (Feuilleley et al., 1988), миокарде (Head et al., 2006), лейкоцитах (Rudolph et al., 1977), клетках Лейдига (Saltarelli et al., 1984), клетках яичников китайского хомячка (Nishigaki et al., 1998) и клетках лимфомы (Leiber et al., 1993; Jasper et al., 1995). В макрофагах морской свинки колхицин и винбластин повышают стимулирующие АЦ эффекты изопротеренола и проста-

гландина E_1 в 7—50 раз (Hagmann, Fishman, 1980). Стимулирующее влияние ингибиторов митоза на функциональное состояние АЦ-системы объясняется способностью связанного с ГТФ тубулина, генерируемого из микротрубочек вследствие деполимеризации, взаимодействовать с α -субъединицей G_s -белка, активировать ее и в конечном итоге стимулировать АЦ (Layden et al., 2008).

Следует, однако, отметить, что имеются данные о том, что у позвоночных животных обработка ингибиторами митоза, так же как и в случае инфузорий, может приводить к ингибированию стимулирующих АЦ эффектов гормонов. Так, например, колхицин практически полностью подавляет стимуляцию АЦ-системы пептидными гормонами — адренкортикотропным гормоном и ангиотензином — в надпочечниках и культуре клеток клубочковой зоны надпочечников (Feuilleley et al., 1988, 1994; Cote et al., 1997). Эти результаты свидетельствуют о многообразии молекулярных механизмов влияния деполимеризации микротрубочек на сопряженные с G_s -белками сигнальные системы.

Эффекты гормонов, реализующих свое действие через $G_{i/o}$ - и $G_{q/11}$ -белки, менее или вовсе не чувствительны к обработке ингибиторами митоза (Leiber et al., 1993; Jasper et al., 1995). Так, инкубация клеток лимфомы с колхицином и цитохалазином В не влияет на ингибирование активности АЦ соматостатином, которое осуществляется через G_i -белки, а также на модуляцию активности адренергических рецепторов коклюшным токсином, который специфично взаимодействует с $G_{i/o}$ -белками.

Полученные нами данные в отношении инфузории *D. anser* также свидетельствуют о том, что ингибиторы митоза практически не влияют на сопряженные с G_i -белками сигнальные пути. Ранее нами было показано, что адреналин оказывает на АЦ-систему *D. anser* как стимулирующее (через G_s -белки), так и ингибирующее (через G_i -белки) влияние (Шпаков и др., 2004). При этом результирующий эффект влияния гормона на активность АЦ складывается из его стимулирующего и ингибирующего АЦ эффектов, а результирующий эффект влияния гормона на ГТФ-связывание представляет собой сумму его стимулирующих эффектов на G_s - и G_i -белки. В настоящем исследовании показано, что стимулирующий эффект адреналина на ГТФ-связывание после обработки ингибиторами митоза снижается только до 43—48 %, в то время как в случае других гормонов, которые не способны активировать G_i -белки, — до 13—24 %. Это объясняется сохранением стимулирующего эффекта адреналина на G_i -белки в клетках, обработанных колхицином и винбластином. На это указывает и тот факт, что как в инкубированных с ингибиторами митоза клетках инфузорий, так и в контрольных клетках стимулирующий ГТФ-связывание эффект адреналина снижается в присутствии йохимбина, селективного антагониста α_2 -адренергических рецепторов, который блокирует передачу ингибирующего адреналинового сигнала к АЦ. Наконец, инкубация с 10^{-5} М колхицином приводит не только к блокированию стимулирующего АЦ эффекта адреналина, но и к выявлению его ингибирующего АЦ эффекта, чего не наблюдается в случае других исследованных нами гормонов.

Выявленная нами и другими авторами селективность влияния ингибиторов митоза на передачу стимулирующего гормонального сигнала через АЦ-систему связана с тем, что микротрубочки и другие элементы цитоскелета наиболее эффективно взаимодействуют с G_s -белками, наиболее древним классом гетеротримерных G-белков.

Имеется много работ, в которых обнаружена прочная ассоциация G_s -белков с микротрубочками и микрофиламентами, а также с их структурными блоками — тубулином и актином (Wang et al., 1990; Cote et al., 1997; Layden et al., 2008; Roachowdhury, Rasenick, 2008). Показано, что обработка колхицином и цитохалазином В приводит к диссоциации α -субъединиц G_s -белков из плазматической мембраны, что является следствием нарушения их взаимодействия с микротрубочками (Head et al., 2006). В то же время имеются сведения о способности микротрубочек взаимодействовать с α -субъединицами G_q - и G_{11} -белков, а также с $\beta_1\gamma_2$ -димером, который генерируется различными типами G-белков (Wang et al., 1990; Popova, Rasenick, 2003; Dave et al., 2009). Однако в этом случае результатом такого взаимодействия является контроль функционирования микротрубочек через посредство гормональной активности сопряженных с этими G-белками сигнальных систем, а не регуляция микротрубочками процесса передачи гормонального сигнала через сопряженные с G_q - и G_{11} -белками сигнальные каскады. Другими словами, только при взаимодействии микротрубочек и активированных гормоном G_s -белков наблюдается их взаимная регуляция.

Таким образом, нами впервые показано, что у представителей одноклеточных организмов — инфузорий *D. anser* — микротрубочки вовлечены в регуляцию цАМФ-зависимых сигнальных путей. Разрушение микротрубочек колхицином и винбластином приводит к прерыванию передачи стимулирующих гормональных сигналов к АЦ. Возникающие нарушения, как мы полагаем, локализованы на уровне гетеротримерного G-белка стимулирующего типа, осуществляющего сопряжение гормонального рецептора с АЦ. Совокупность полученных нами данных свидетельствует о том, что функциональное состояние структурных элементов цитоскелета у инфузорий *D. anser* определяет их чувствительность к веществам гормональной природы и контролирует ответ клетки на гормональное воздействие.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00692а) и Фонда содействия отечественной науке.

Список литературы

Деркач К. В., Шпаков А. О., Кузнецова Л. А., Плеснева С. А., Успенская З. И., Перцева М. Н. 2002. Гормоночувствительная аденилатциклазная система инфузории *Dileptus anser*. Цитология. 44 (11) : 1129—1134.

Шпаков А. О. 2007. Структурно-функциональная организация аденилатциклазы одноклеточных эукариот. Цитология. 49 (2) : 91—106.

Шпаков А. О., Деркач К. В., Успенская З. И., Кузнецова Л. А., Плеснева С. А., Перцева М. Н. 2003. Регуляция биогенными аминами и пептидными гормонами активности аденилатциклазы и протеинкиназы А у инфузорий *Dileptus anser* и *Tetrahymena pyriformis*. Докл. РАН. 378 (2) : 275—277.

Шпаков А. О., Деркач К. В., Успенская З. И., Шпакова Е. А., Кузнецова Л. А., Плеснева С. А., Перцева М. Н. 2004. Молекулярные механизмы регуляторного влияния агонистов адренергических рецепторов на функциональную активность аденилатциклазной сигнальной системы инфузорий *Dileptus anser* и *Tetrahymena pyriformis*. Цитология. 46 (4) : 317—325.

Шпаков А. О., Плеснева С. А., Кузнецова Л. А., Перцева М. Н. 2002. Исследование функциональной организации нового аденилатциклазного сигнального механизма действия инсулина. Биохимия. 67 (3) : 403—412.

Шпаков А. О., Успенская З. И., Деркач К. В., Кузнецова Л. А., Плеснева С. А., Перцева М. Н. 2007. Регуляторное влияние кальция на функциональную активность аденилатциклазы инфузории *Dileptus anser*. Журн. эволюц. биохим. физиол. 43 (2) : 109—115.

Cote M., Payet M. D., Gallo-Payet N. 1997. Association of α_s -subunit of the G_s protein with microfilaments and microtubules: implication during adrenocorticotropin stimulation in rat adrenal glomerulosa cells. Endocrinology. 138 : 69—78.

Dave R. H., Saengsawang W., Yu J. Z., Donati R., Rasenick M. M. 2009. Heterotrimeric G-proteins interact directly with cytoskeletal components to modify microtubule-dependent cellular processes. Neurosignals. 17 : 100—108.

Desai A., Mitchison T. J. 1997. Microtubule polymerization dynamics. Annu. Rev. Cell Develop. Biol. 13 : 83—117.

Feuilletoy M., Contesse V., Lefebvre H., Delarue C., Vaudry H. 1994. Effects of selective disruption of cytoskeletal elements on steroid secretion by human adrenocortical slices. Amer. J. Physiol. 266 : 202—210.

Feuilletoy M., Netchitailo P., Delarue C., Leboulanger F., Benyamina M., Pelletier G., Vaudry H. 1988. Involvement of the cytoskeleton in the steroidogenic response of frog adrenal glands to angiotensin II, acetylcholine and serotonin. J. Endocrinol. 118 : 365—374.

Fujii K., Numata O. 1999. Localization of microtubules during macronuclear division in *Tetrahymena* and possible involvement of macronuclear microtubules in «atomic» chromatin distribution. Cell Struct. Funct. 24 : 401—404.

Hagmann J., Fishman P. H. 1980. Modulation of adenylate cyclase in intact macrophages by microtubules. J. Biol. Chem. 255 : 2659—2662.

Hamilton E. P., Suhr-Jessen P. B., Orias E. 1988. Pronuclear fusion failure: an alternate conjugational pathway in *Tetrahymena thermophila*, induced by vinblastine. Genetics. 118 : 627—636.

Head B. P., Patel H. H., Roth D. M., Murray F., Swaney J. S., Niesman I. R., Farquhar M. G., Insel P. A. 2006. Microtubules and actin microfilaments regulate lipid raft/caveolae localization of adenylyl cyclase signaling components. J. Biol. Chem. 281 : 26 391—26 399.

Ibarrondo J., Joubert D., Dufour M. N., Cohen-Solal A., Hamburger V., Jard S., Guillon G. 1995. Close association of the α subunits of G_q and G_{11} proteins with actin filaments in WRK₁ cells: relation to G protein-mediated phospholipase C activation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 92 : 8413—8417.

Jasper J. R., Post S. R., Desai K. H., Insel P. A., Bernstein D. 1995. Colchicine and cytochalasin B enhance cyclic AMP accumulation via postreceptor actions. J. Pharmacol. Exp. Ther. 274 : 937—942.

Kovacs P., Csaba G. 2006. Effect of drugs affecting microtubular assembly on microtubules, phospholipid synthesis and physiological indices (signalling, growth, motility and phagocytosis) in *Tetrahymena pyriformis*. Cell Biochem. Funct. 24 : 419—429.

Layden B. T., Saengsawang W., Donati R. J., Yang S., Mulhearn D. C., Johnson M. E., Rasenick M. M. 2008. Structural model of a complex between the heterotrimeric G protein, $G_s\alpha$ and tubulin. Biochim. biophys. acta. 1783 : 964—973.

Leiber D., Jasper J. R., Alousi A. A., Marin J., Bernstein D., Insel P. A. 1993. Alteration in G_s -mediated signal transduction in S49 lymphoma cells treated with inhibitors of microtubules. J. Biol. Chem. 268 : 3833—3837.

Margolis R. L., Wilson L. 1977. Addition of colchicine-tubulin complex to microtubule ends: the mechanism of substoichiometric colchicine poisoning. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 74 : 3466—3470.

Nishigaki N., Chang C., Ichikawa A., Negishi M. 1998. Cytoskeletal regulation of the signal transduction of prostaglandin EP4 receptor. Biochim. biophys. acta. 1391 : 110—116.

Ono T., Nakabayashi T. 1987. Possible conversion of axoneal microtubules to pellicular microtubules in *Trypanosoma gambiense* treated with vinblastine, colchicine plus concanavalin A. Bi-ken J. 30 : 25—28.

Owells R. J., Hartke C. A., Dickerson R. M., Hains F. O. 1976. Inhibition of tubulin-microtubule polymerization by drugs of the *Vinca* alkaloid class. *Cancer Res.* 36 : 1499—1502.

Popova J. S., Rasenick M. M. 2003. G $\beta\gamma$ mediates the interplay between tubulin dimers and microtubules in the modulation of G $_q$ signaling. *J. Biol. Chem.* 278 : 34 299—34 308.

Roychowdhury S., Rasenick M. 2008. Submembraneous microtubule cytoskeleton: regulation of microtubule assembly by heterotrimeric G proteins. *FEBS J.* 275 : 4654—4663.

Rudolph S.A., Greengard P., Malawista S.E. 1977. Effects of colchicines on cyclic AMP levels in human leukocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 74 : 3404—3408.

Saltarelli D., La Llosa-Hermier M., Tertrin-Lary C., Hermier C. 1984. Effects of antimicrotubular agents in cAMP production and in steroidogenic response of isolated rat Leydig cells. *Biol. Cell.* 52 : 259—266.

Schultz J. E., Guo Y. L., Kleefeld G., Volkel H. 1997. Hyperpolarization- and depolarization-activated Ca $^{2+}$ currents in *Paramecium*

trigger behavioral changes and cGMP formation independently. *J. Membrane Biol.* 156 : 251—259.

Shpakov A. O., Kuznetsova L. A., Plesneva S. A., Kolychev A. P., Bondareva V. M., Chistyakova O. V., Pertseva M. N. 2006. Functional defects in adenylyl cyclase signaling mechanisms of insulin and relaxin action in skeletal muscles of rat with streptozotocin type 1 diabetes. *Cent. Eur. J. Biol.* 1 : 530—544.

Shpakov A. O., Pertseva M. N. 2008. Signaling systems of lower eukaryotes and their evolution. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 269 : 151—282.

Wang N., Yan K., Rasenick M. M. 1990. Tubulin binds specifically to the signal-transducing proteins, G $_s\alpha$ and G α_1 . *J. Biol. Chem.* 265 : 1239—1242.

Wolff J., Cook G. H. 1985. Microtubule-associated adenylyl cyclase. *Biochim. biophys. acta.* 844 : 34—41.

Zor U. 1983. Role of cytoskeletal organization in the regulation of adenylyl cyclase-cyclic adenosine monophosphate by hormones. *Endocrinol. Rev.* 4 : 1—21.

Поступила 19 V 2009

INHIBITION OF THE ADENYLYL CYCLASE SIGNALING SYSTEM BY COLCHICINE AND VINBLASTINE IN CILIATE *DILEPTUS ANSER*

K. V. Derkach,¹ A. O. Shpakov,¹ Z. I. Uspenskaya,² L. A. Kuznetsova¹

¹ I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS and ² Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: alex_shpakov@list.ru

Cytoskeleton plays a key role in functioning of hormonal signaling systems in vertebrate animals. The data on the influence of cytoskeleton components, in particular the microtubules, on functional activity of chemosignaling systems of unicellular organisms are absent at the present time. The aim of this work was the study of influence of microtubule-disrupting agents, colchicine and vinblastine, on the adenylyl cyclase (AC) system of free-living ciliate *Dileptus anser*. The treatment of *D. anser* with colchicine and vinblastine (10^{-5} — 10^{-6} M) weakly influenced basal activity of AC, but caused essential decrease or complete blocking of AC stimulation by non-hormonal (GppNHp, sodium fluoride) and hormonal (adrenaline, serotonin, glucagon) agents. As a result of this treatment, a decrease of the basal level of GTP-binding of heterotrimeric G-proteins and inhibition of G-protein stimulation by the hormones were found. In the case of adrenaline it was that colchicine and vinblastine disturb the AC stimulation by the hormone, mediated with the G $_s$ -protein, but weakly influence its inhibitory AC effect, realized via the G $_i$ -protein. Thus, it was established for the first time that microtubules in unicellular organisms such as the ciliate *D. anser* are involved in regulation of functional activity of AC system, and their action is realized at the level of the G-proteins similar to the G $_s$ -proteins of the vertebrates.

Key words: adenylyl cyclase, vinblastine, heterotrimeric G-protein, GTP-binding, ciliate *Dileptus anser*, colchicine, microtubules, cytoskeleton.