

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОК MDCK, ИНДУЦИРОВАННЫЕ АРГИНИН-ВАЗОПРЕССИНОМ

© А. Н. Горшков,¹ Е. С. Снизиревская, Я. Ю. Комиссарчик

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; ¹ электронный адрес: angorsh@yahoo.com

Методами электронной и флуоресцентной микроскопии изучены изменения структурной организации клеток MDCK в условиях действия аргинин-вазопрессина (АВП). Получены электронно-микроскопические подтверждения того, что клетки MDCK в составе монослоя имеют структурно различающиеся апикальную и базолатеральную поверхности, разделенные хорошо сформированными зонами межклеточных контактов. Установлено, что АВП специфически связывается с рецепторами на базолатеральной поверхности клеток, а затем через 10—15 мин интернализуется с клеточной поверхности. Воздействие АВП вызывает фрагментацию аппарата Гольджи и набухание его цистерн, обусловленное появлением осмотического водного потока через монослой. Обнаружена значительная деполимеризация актинового цитоскелета клеток в условиях воздействия АВП или форсколина — активатора аденилатциклазы. Обсуждаются функциональная роль и регуляторные механизмы наблюдаемых структурных изменений.

Ключевые слова: аргинин-вазопрессин, транспорт воды, клетки MDCK, актиновый цитоскелет.

Принятые сокращения: АВП — аргинин-вазопрессин, ПКА — протеин-киназа А, цАМФ — циклический аденозинмонофосфат, AQP2 — аквапорин 2.

Пептидный гормон аргинин-вазопрессин (АВП) является ключевым регулятором процесса реабсорбции воды в собирательных трубках почки млекопитающих. Связывание АВП со специфическими рецепторами V2-типа, локализованными в базолатеральной мембране основных клеток собирательных трубок, запускает в этих клетках аденилат-циклизный сигнальный путь, приводящий к росту внутриклеточной концентрации циклического АМФ (цАМФ) и последующей активации протеин-киназы А (ПКА) (Skorecki et al., 1992; Наточин, 1994). На молекулярном уровне трансэпителиальный осмотический водный поток осуществляется белками водных каналов — аквапоринами. Определяющую роль в быстрых изменениях водной проницаемости эпителия собирательных трубок в условиях воздействия АВП играет аквапорин 2 (AQP2). AQP2 локализуется в апикальной мембране основных клеток собирательных трубок и в субмембранных везикулах (Nielsen et al., 1993). Связывание АВП с V2-рецепторами и последующий каскад внутриклеточной сигнализации приводят к фосфорилированию AQP2 ПКА по серину 256 (Fushimi et al., 1997; Katsura et al., 1997) и транслокации AQP2 от пула цитоплазматических везикул в апикальную мембрану (Marples et al., 1995; Nielsen et al., 1995), что и является непосредственной причиной индуцированного вазопрессинном роста трансэпителиального водного потока.

Из данных ряда работ известно, что актиновый цитоскелет эпителиоцитов является одним из важнейших участников АВП-индуцированного трансэпителиального транспорта воды. Первоначально существенная функциональная роль актиновых филаментов в развитии гидроосмотического ответа плотных вазопрессин-чувствитель-

ных эпителиев была экспериментально продемонстрирована на эпителии мочевого пузыря амфибий в исследованиях с использованием цитохалазинов. Блокировка функции F-актина цитохалазинами значительно снижает величину АВП-индуцированного потока воды через эпителий мочевого пузыря амфибий и уменьшает плотность сайтов высокой водной проницаемости, появляющихся в апикальной мембране эпителиоцитов (Parisi et al., 1985; Pearl, Taylor, 1985; Wade, Kachadorian, 1988).

Впоследствии важнейшая роль актина в индуцированном вазопрессинном росте водной проницаемости транспортирующих воду эпителиев была выявлена и для эпителиев млекопитающих. Наиболее убедительны в этом отношении данные о том, что, экспериментально манипулируя уровнем полимеризации (деполимеризации) актина в клетках первичной культуры собирательных трубок, можно получить или, напротив, ингибировать транслокацию AQP2 без гормонального воздействия на клетки (Tamma et al., 2001).

В целом, несмотря на интенсивное изучение в течение последнего десятилетия молекулярных механизмов АВП-индуцированной транслокации AQP2 и достигнутый значительный прогресс (см. обзоры: Снизиревская, Комиссарчик, 1999; Klussmann et al., 2000; Nielsen et al., 2002; Brown, 2003; Noda, Sasaki, 2005), исчерпывающей картины данного процесса до настоящего времени не получено. В частности, слабо изучены молекулярные механизмы взаимодействий AQP2 с актиновым цитоскелетом и белки — участники данных взаимодействий.

Методические сложности и ограничения, возникающие при исследовании механизмов транспорта воды в почке животных, вызвали необходимость выбора более

удобных культуральных экспериментальных моделей осморегулирующих эпителиев. Такими моделями стали полученные более 30 лет назад клеточные линии MDCK и LLC-PK1, происходящие из собирательных трубок почки собаки и свиньи соответственно. В ряде работ установлено, что по важнейшим морфофункциональным параметрам монослои этих клеток сходны с эпителием собирательных трубок почки. Данные клеточные линии в конфлюэнтной культуре формируют поляризованные эпителиальные слои с развитыми зонами межклеточных контактов (Hull et al., 1976; Misfeldt et al., 1976; Kreisberg, Wilson, 1988). Монослои клеток MDCK и LLC-PK1 обладают высоким трансэпителиальным сопротивлением, что является свойством плотных водонепроницаемых эпителиев (Misfeldt et al., 1976; Handler et al., 1980). Данные клеточные линии экспрессируют функционально активные V2-рецепторы к вазопрессину (Ehnis et al., 1993; Robben et al., 2004) и отвечают на воздействие вазопрессина подъемом внутриклеточной концентрации цАМФ и активацией PKA (Rindler et al., 1979; Handler et al., 1980; Mita et al., 1980; Strewler, 1984).

В совокупности перечисленные факты делают линии MDCK и LLC-PK1 ценными модельными объектами для анализа различных аспектов клеточного действия АВП. Вместе с тем выяснено, что экспрессия аквапоринов в клетках MDCK и LLC-PK1 отличается от клеток собирательных трубок *in vivo*. В базолатеральных мембранах клеток MDCK присутствует небольшое количество AQP3, причем экспрессия данного белка может быть значительно усилена помещением клеток в гипертоничную среду (Matsuzaki et al., 2001). В то же время экспрессия AQP2 — главной мишени действия АВП — в данных клеточных линиях подавлена (Furuno et al., 1996).

Таким образом, клетки MDCK и LLC-PK1 являются вполне адекватными модельными объектами для исследования всех этапов гидроосмотического ответа (рецепция, внутриклеточная сигнализация, индуцированная вазопрессинем реорганизация цитоскелета, структурные изменения и транспорт внутриклеточных органоидов), за исключением его терминального звена — транслокации AQP2. Для непосредственного анализа транслокации AQP2 в нескольких лабораториях были получены клеточные линии MDCK и LLC-PK1, стабильно трансфицированные ДНК AQP2 или GFP-AQP2 (Katsura et al., 1995; Deen et al., 1997; Gustafson et al., 1998; Tajika et al., 2004).

Целью настоящей работы было, во-первых, получить доказательства того, что имеющиеся в нашем распоряжении клетки MDCK являются адекватной моделью для анализа клеточных механизмов действия вазопрессина. Во-вторых, была поставлена задача проследить изменения ультраструктуры и реорганизацию актинового цитоскелета в клетках MDCK при воздействии на них АВП. Полученные нами результаты морфологического анализа позволяют сделать вывод о существенной роли системы актиновых филаментов в клеточном ответе на действие АВП.

Материал и методика

Клетки MDCK были получены из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН и соответствуют клеткам MDCK American Type Culture Collection, cat. No CCL 34. Клетки культивировали в пластиковых чашках Петри в среде DMEM, содержащей

50 мкг/мл гентамицина, с добавлением 10 % эмбриональной коровьей сыворотки. Клетки культивировали при 37 °С в атмосфере, содержащей 5 % CO₂. Для всех исследований, выполненных в данной работе, клетки были использованы через 4—5 сут после посева, при достижении ими 90—95 % конфлюэнтности.

В качестве негативного контроля специфичности связывания АВП с клетками нами были использованы клетки HeLa, как известно, не содержащие на своей поверхности специфических рецепторов к вазопрессину. Клетки HeLa были получены из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН и культивировались в той же среде и в тех же условиях, что и клетки MDCK.

Электронно-микроскопический анализ АВП-индуцированных изменений ультраструктуры клеток MDCK. Для электронно-микроскопического исследования клетки MDCK были выращены на покровных стеклах, помещенных в 35-миллиметровые пластиковые чашки Петри. Клетки изучали в контрольных условиях (без воздействия АВП) и после инкубации в АВП в течение 20 мин. АВП был добавлен в чашки Петри, содержащие экспериментальные клетки, в действующей концентрации 10⁻⁶ М.

Покровные стекла с клетками были префиксированы 2.5%-ным раствором глутаральдегида на 0.01 М фосфатном буфере, pH 7.4, в течение 30 мин при комнатной температуре, троекратно промыты фосфатным буфером и постфиксированы 1%-ным раствором OsO₄, на том же буфере при той же температуре в течение 1 ч. Затем клетки на стеклах были дегидратированы в серии растворов этанола возрастающей концентрации и заключены в эпоксидную смолу Араалдит.

Перед получением ультратонких срезов изучаемого материала покровные стекла были удалены. Оставшиеся после удаления стеклов блоки полимеризованной смолы Араалдит с содержащимися в них клеточными слоями были порезаны на ультрамикротоме LKB. Ультратонкие срезы исследуемых образцов толщиной до 800 ангстрем были собраны на сетки с коллодиевой подложкой, после чего сетки со срезами были отконтрастированы в уранил-ацетате и цитрате свинца и исследованы в электронном микроскопе JEM 100U. Для получения электронных микрофотографий была использована фотопленка Camera 2000 (Kodak).

Флуоресцентно-микроскопический анализ связывания АВП с клетками. Клетки были выращены на покровных стеклах аналогично предыдущему исследованию. В чашки Петри, содержащие экспериментальные клетки, был добавлен АВП в действующей концентрации 10⁻⁶ М. Покровные стекла с клетками через различные временные интервалы воздействия АВП (30 с, 2, 5, 10 и 15 мин) были в течение 10 мин зафиксированы 4%-ным раствором параформальдегида на 0.01 М фосфатном буфере, pH 7.4. В качестве контролей аналогичным образом были зафиксированы покровные стекла с клетками MDCK, не подвергавшиеся инкубации с вазопрессинем, а также стекла с клетками HeLa, инкубированные с вазопрессинем аналогично клеткам MDCK.

Для иммунодетекции связанного с рецепторами АВП были использованы поликлональные кроличьи антитела против АВП. Вторичными антителами служили антитела против иммуноглобулинов кролика Alexa 488.

Покровные стекла с экспериментальными и контрольными клетками после фиксации были промыты фосфат-

ным буфером и проинкубированы в первичных антителах, разведенных 1%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина в фосфатном буфере (1 : 50), в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем были проведены трехкратная промывка стекол фосфатным буфером и их инкубация в растворе вторичных антител, разведенных аналогичным образом в соотношении 1 : 100, в течение 40 мин при комнатной температуре. После повторной трехкратной промывки в фосфатном буфере покровные стекла с клетками были заключены в препятствующую фотобеливанию среду DABCO.

Флуоресцентные изображения изучаемых клеток были получены с помощью микроскопа Axioscope Zeiss (объектив 100×).

Для количественной оценки интенсивности флуоресценции опытных и контрольных препаратов было получено по 30—40 изображений клеток в каждом случае, при этом использованные настройки экспозиции и чувствительности цифровой фотокамеры оставались неизменными во всех случаях. В дальнейшем с помощью программы Image J (NIH) была получена численная оценка средней интенсивности флуоресценции занятой клетками области на каждом цифровом изображении, при этом изображения не подвергались графическому редактированию — для исключения искажений значений интенсивности флуоресценции. Статистическая достоверность различий интенсивности флуоресценции между опытными и контрольными препаратами была оценена с помощью непарного *t*-теста Стьюдента.

Флуоресцентно-микроскопический анализ распределения актина в клетках MDCK. Клетки были выращены на покровных стеклах, аналогично описанным выше исследованиям. Покровные стекла с клетками были зафиксированы в контрольных условиях (без воздействия АВП), через 20 мин инкубации в 10^{-6} М АВП или через 20 мин инкубации в 10^{-4} М форсколина. Фиксацию проводили в течение 10 мин 4%-ным раствором параформальдегида на 0.01 М фосфатном буфере, pH 7.4. После фиксации была выполнена пермеабиллизация мембран клеток посредством их обработки 0.1%-ным раствором Тритона X-100 на фосфатном буфере в течение 5 мин. Визуализацию актина в клетках осуществляли с помощью родамин-фаллоидина. После пермеабиллизации стекла с клетками были в течение 40 мин проинкубированы в родамин-фаллоидине, разведенном 1%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина в фосфатном буфере в соотношении 1 : 200, трехкратно промыты фосфатным буфером и заключены в среду DABCO.

Препараты были изучены с помощью флуоресцентного микроскопа Axioscope Zeiss, снабженного CCD-фотокамерой, и конфокального микроскопа Leica TCS. Во флуоресцентном микроскопе Axioscope Zeiss препараты анализировали под масляным иммерсионным объективом 100×. Возбуждение флуоресценции родамин-фаллоидина в этом случае проводили светом с длиной волны 540 нм. В конфокальном микроскопе Leica TCS также был использован масляный иммерсионный объектив 100×. Для возбуждения флуоресценции был использован HeNe-лазер с длиной волны 543 нм.

В конфокальном микроскопе были получены одиночные сканированные изображения препаратов, а также серии последовательных изображений по вертикальной оси. Впоследствии с помощью программы LCS Lite из этих серий были реконструированы вертикальные срезы монослоя.

Цифровые изображения препаратов были отредактированы с помощью программы Adobe Photoshop CS2 таким образом, чтобы при этом не исказить содержащуюся в них биологическую информацию.

Использованные реактивы: пластиковая посуда для культивирования клеток (NUNC, США); среда DMEM, эмбриональная коровья сыворотка и фосфатный буферный раствор (Биолот, Россия); аргинин-вазопрессин и поликлональные кроличьи антитела против аргинин-вазопрессина (ICN Pharmaceuticals, США); форсколин (Sigma, США); глутаральдегид (Fluca, США); параформальдегид (ТААВ, Германия); родамин-фаллоидин и вторичные антитела Alexa 488 antirabbit (Molecular Probes, США).

Результаты

Электронно-микроскопическое исследование тонкой структуры клеток MDCK в контрольных условиях (без воздействия АВП) выявило, что конфлюэнтный монослой MDCK состоит из уплощенных полярных клеток, толщина которых составляет 3—5 мкм. Апоикальная поверхность клеток содержит многочисленные микроворсинки (рис. 1, *а*). Между клетками имеются развитые зоны межклеточных контактов — плотные, промежуточные контакты и десмосомы (рис. 1, *б*, *в*). В базальных частях клеток присутствуют контактирующие друг с другом базальные отростки цитоплазмы — интердигитации (рис. 1, *в*).

Актиновые микрофиламенты обнаруживаются в кортикальном слое под апоикальной мембраной, в апоикальных микроворсинках, в областях межклеточных контактов, а также в виде отдельных пучков в цитоплазме клеток (рис. 1, *б*).

В цитоплазме значительно развиты элементы аппарата Гольджи (рис. 2, *а*, *б*), представленные несколькими стопками уплощенных цистерн и многочисленными везикулами по их периферии. Элементы аппарата Гольджи локализованы преимущественно в надъядерной зоне цитоплазмы. В непосредственной близости от аппарата Гольджи обнаруживаются микротрубочки (рис. 2, *б*).

Анализ организации актинового цитоскелета клеток MDCK с помощью флуоресцентной и сканирующей конфокальной микроскопии выявил, что в клетках присутствуют три основных пула актиновых филаментов. В апоикальной области цитоплазмы актин обнаруживается в микроворсинках, а также в виде умеренно флуоресцирующей субмембранной сети (рис. 3, *а*). В средней зоне цитоплазмы, на уровне ядер и выше, по клеточным границам локализован актин, ассоциированный с межклеточными контактами (рис. 3, *б*). В базальной зоне цитоплазмы клеток MDCK, как правило, имеются стресс-фибриллы, ассоциированные с фокальными контактами (рис. 3, *в*). Три основных пула актина хорошо различимы также на вертикальном срезе монослоя, реконструированном из серии горизонтальных оптических срезов (рис. 3, *г*). В дополнение к вышеуказанным пулам микрофиламентов в некоторых клетках наблюдается формирование уплощенных ламеллоподий, с которыми также ассоциированы актиновые филаменты (рис. 3, *д*). Появление ламеллоподий в основном свойственно одиночным клеткам, находящимся вне конфлюэнтного монослоя, хотя и в составе монослоя могут обнаруживаться клетки с ламеллоподиальной активностью.

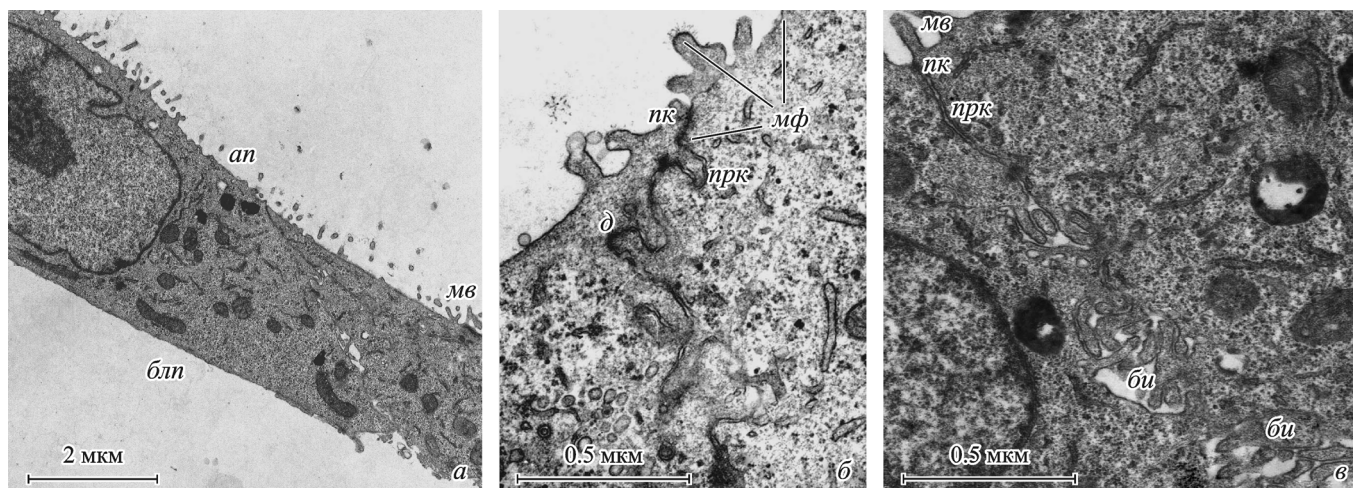


Рис. 1. Ультраструктурная организация монослоя клеток MDCK в контрольных условиях.

а — общий вид монослоя; *ап* — апикальная поверхность, *мв* — микроворсинки, *блп* — базолатеральная поверхность. *б* — зона межклеточных контактов между двумя клетками; *нк* — плотный контакт, *прк* — промежуточный контакт, *д* — десмосома, *мф* — микрофиламенты. *в* — межклеточная щель с интердигитациями базолатеральной поверхности клеток; *би* — базальные интердигитации.

Для получения экспериментального подтверждения того, что АВП воздействует на использованные нами клетки MDCK, мы провели флуоресцентно-микроскопическое исследование связывания АВП с рецепторами к нему на клеточной поверхности. Обнаружено, что при инкубации клеток в АВП (10^{-6} М) и последующей иммунодетекции вазопрессина меченный антителами АВП выявляется в виде небольших интенсивно флуоресцирующих кластеров преимущественно на базальной поверхности клеток (рис. 4, *а*). Подобные кластеры не обнаруживаются в негативных контролях — при иммуноцитохимическом окрашивании клеток MDCK, не инкубированных в АВП (не показано), и при окрашивании инкубированных в АВП клеток HeLa, не экспрессирующих специфических рецепторов к вазопрессину (рис. 4, *б*).

Проведенный с помощью программы Image J количественный морфометрический анализ динамики связывания АВП клетками MDCK обнаружил, что уже через 30 с после начала эксперимента наблюдается резкое увеличение иммунофлуоресценции меченных антителами клеток по сравнению с фоновой флуоресценцией контрольных

(без добавления АВП) образцов. На более поздних сроках инкубации (2—15 мин) количество связанного АВП на поверхности клеток постепенно снижается, очевидно за счет интернализации лиганд-рецепторных комплексов (рис. 5).

Ультраструктурный анализ клеток MDCK в условиях воздействия АВП обнаружил, что инкубация клеток в 10^{-6} М АВП в течение 20 мин вызывает ряд изменений в их тонкой организации. В конфлюэнтном монослое наблюдаются расширение межклеточных щелей и расхождение базальных интердигитаций соседних клеток (рис. 6, *а*, *б*). В цитоплазме клеток происходит фрагментация аппарата Гольджи и выраженное набухание цистерн Гольджи (рис. 6, *а*, *б*).

Активный цитоскелет в значительной мере деполимеризуется. На ультратонких срезах особенно хорошо прослеживается снижение плотности слоя субмембранного апикального актина. В апикальной зоне клеток пучки актиновых филаментов сохраняются только в микроворсинках, а также в области плотных и промежуточных межклеточных контактов (рис. 6, *в*). В целом в условиях

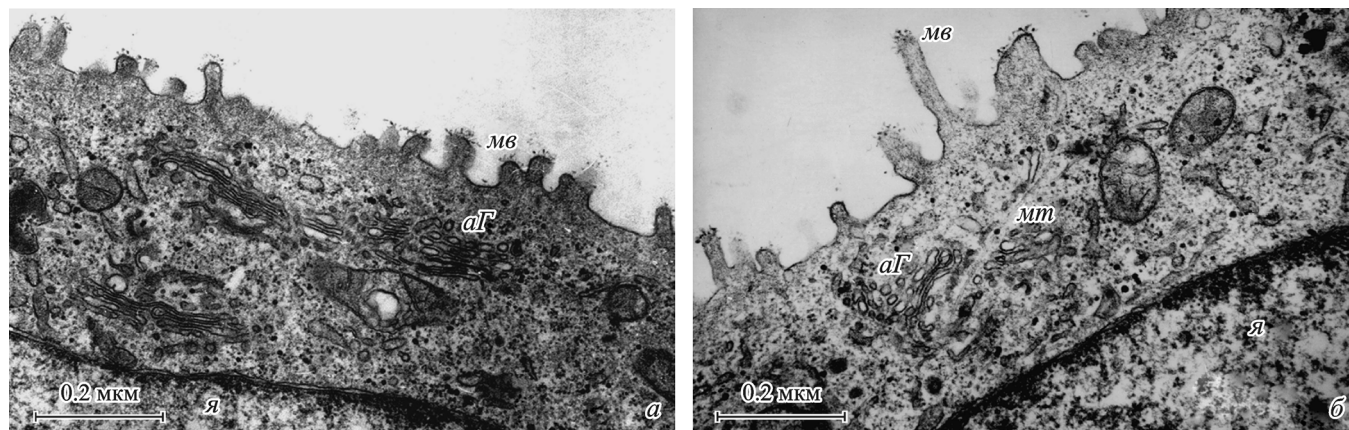


Рис. 2. Аппарат Гольджи в клетках MDCK в контрольных условиях.

а — общий вид аппарата Гольджи; *мв* — микроворсинки, *аГ* — аппарат Гольджи, *я* — ядро. *б* — микротрубочки (*mt*) ассоциированы с аппаратом Гольджи.

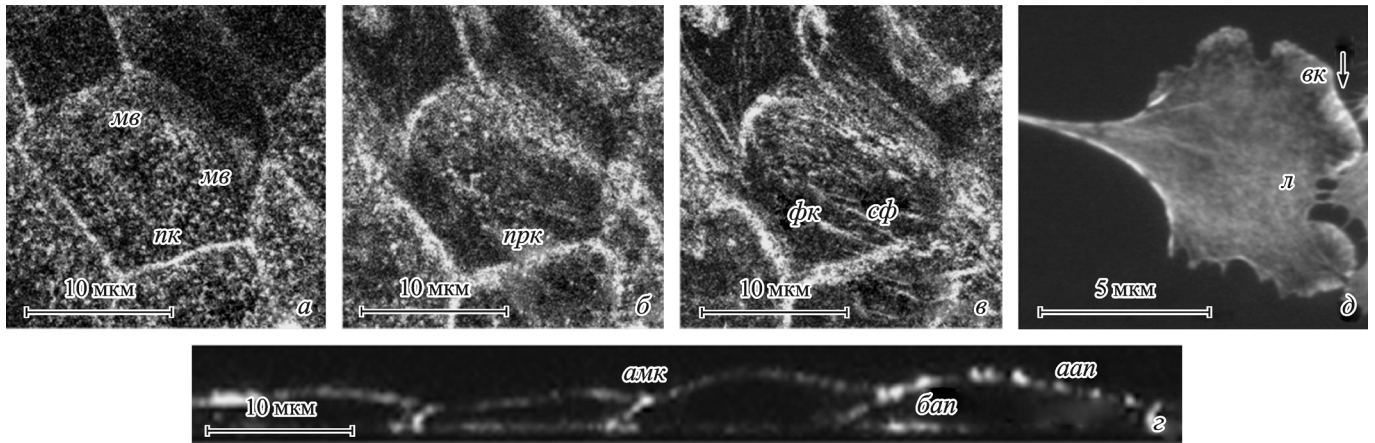


Рис. 3. Визуализация актина родамин-фаллоидином в клетках MDCK в контрольных условиях.

a–в — горизонтальные оптические срезы клетки, полученные в конфокальном микроскопе, на уровне ее апикальной (*a*), средней (*б*) и базальной (*в*) цитоплазмы; *a* — актин выявляется в микроворсинках (*mv*), в области плотных контактов (*нк*) и в виде умеренной флуоресценции всей апикальной субмембранной сети; *б* — актин выявляется в области промежуточных контактов (*прк*); *в* — актин выявляется в стресс-фибриллах (*сф*), заканчивающихся фокальными контактами (*фк*). *г* — вертикальный срез (в плоскости ZX) через монослой MDCK, реконструированный из серии горизонтальных оптических срезов; прослеживаются 3 основных пула актина в клетках: апикальный актиновый пул (*aan*), актин, ассоциированный с межклеточными контактами (*амк*), и базальный актиновый пул (*бан*). *д* — ламеллоподия, образованная клеткой, не находящейся в составе монослоя (флуоресцентная микроскопия); *л* — ламеллоподия; актин локализован преимущественно в области ведущего края (*вк*) и возникающих фокальных комплексах (*стрелка*).

воздействия АВП цитоплазма клеток имеет значительно меньшую электронную плотность, чем цитоплазма клеток в контрольных условиях.

Для флуоресцентно-микроскопической визуализации актина мы выполнили 2 группы экспериментов: клетки MDCK были подвергнуты воздействию 10^{-6} М АВП и 10^{-4} М форсколина (активатора аденилат-циклазы). При обоих экспериментальных воздействиях на клетки мечение их актина родамин-фаллоидином дало сходные результаты, подтверждающие результаты электронной микроскопии.

Флуоресценция актина в клетках после их инкубации в АВП наблюдается в виде точечных кластеров в апикальных микроворсинках (рис. 7, *a*), а также в зонах межклеточных контактов — по границам клеток (рис. 7, *б*). Практически полностью деполимеризуется апикальная субмембранная сеть актина (рис. 7, *a*). В большинстве клеток монослоя исчезают также стресс-фибриллы базальной ци-

топлазмы (рис. 7, *в*). Деполимеризация актина хорошо заметна как на серийных горизонтальных оптических срезах (рис. 7, *a–в*), так и на реконструированном по серии горизонтальных срезов вертикальном срезе (рис. 7, *г*). В целом наблюдается существенное общее снижение интенсивности флуоресценции меченного родамин-фаллоидином актина в клетках в условиях воздействия АВП по сравнению с контрольными клетками (рис. 3, *a–г*; 7, *a–г*).

Сходные изменения — деполимеризация актинового цитоскелета — были выявлены в клетках, инкубированных в 10^{-4} М форсколина (рис. 3, *a–г*; 7, *a–г*).

Необходимо отметить, что при воздействии форсколина мы обнаружили более выраженную деполимеризацию F-актина в клетках, чем при воздействии АВП (рис. 3, *a–г*; 7, *д–з*).

При обоих использованных нами воздействиях во многих клетках в базальной области их цитоплазмы со-

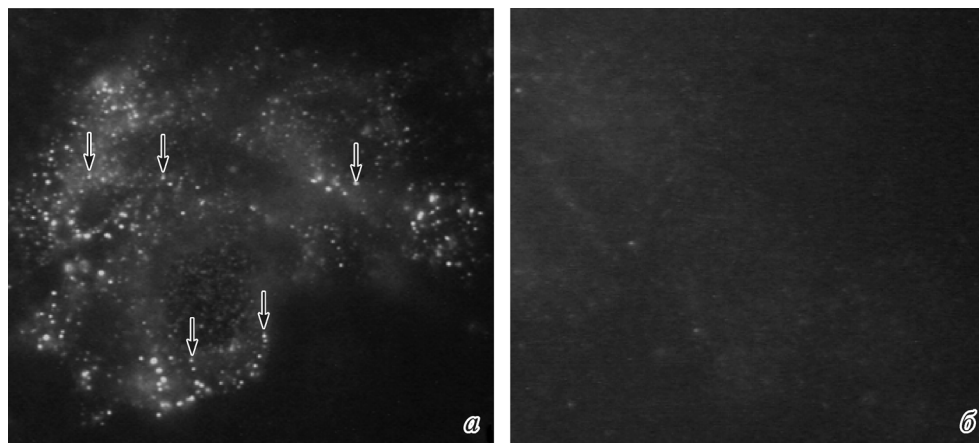


Рис. 4. Локализация меченного антителами АВП на базальной поверхности клеток после их инкубации в 10^{-6} М АВП в течение 30 с.

a — клетки MDCK; *стрелки* показывают кластеры меченного антителами АВП; *б* — клетки HeLa, АВП на поверхности клеток отсутствует.

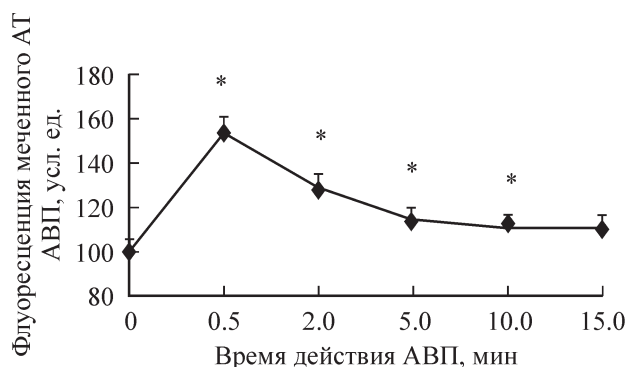


Рис. 5. Динамика связывания АВП клетками MDCK.

Показаны доверительные интервалы средних значений ($P < 0.05$). Звездочки — различие интенсивности флуоресценции меченого антитела АВП на поверхности клеток на данном сроке его действия и фоновой флуоресценции (точка 0 на диаграмме) статистически достоверно при $P < 0.05$.

храняется формирование ламеллоподий. Мы не обнаружили заметного снижения интенсивности флуоресценции меченого актина в области ведущего края ламеллоподий клеток при воздействии АВП (рис. 7, и) или форсколина (не показано) по сравнению с контрольными клетками (рис. 3, д).

Обсуждение

К настоящему времени клетки MDCK неоднократно использовались в качестве культуральной модели для изучения механизмов действия вазопрессина. Вместе с тем в ряде работ было показано, что MDCK представляет собой гетерогенную клеточную линию, в которой разные клетки могут значительно различаться по своей морфологии (Nakazato et al., 1989), набору экспрессируемых рецепторов (Meier et al., 1983), а полученные из нее сублинии — по трансэпителиальному электрическому сопротивлению (Barker, Simmons, 1981; Richardson et al., 1981; Arthur, 2000). Особенно важны данные о том, что клональные клеточные сублинии, полученные из родительской линии MDCK, существенно различаются по уровню внутриклеточной аккумуляции цАМФ в ответ на воздей-

ствии АВП, вплоть до полного отсутствия ответа в одном из субклонов (Nakazato et al., 1989).

С учетом вышеприведенных литературных данных нам было необходимо протестировать имеющиеся непосредственно в нашем распоряжении клетки на предмет их пригодности в качестве модельного объекта для анализа клеточных механизмов действия вазопрессина. С этой целью мы, во-первых, провели электронно-микроскопический анализ организации монослоя MDCK и, во-вторых, изучили динамику связывания АВП со специфическими рецепторами на базолатеральной мембране клеток.

Полученные нами результаты доказывают, что имеющиеся у нас клетки формируют поляризованный эпителиальный монослой с хорошо сформированными зонами межклеточных контактов и морфологически различаемыми апикальной и базолатеральной поверхностями. Эти данные подтверждают опубликованные наблюдения (Hull et al., 1976; Misfeldt et al., 1976; Kreisberg, Wilson, 1988). Толщина монослоя невелика — 3—5 мкм, что соответствует ранее сделанному описанию линии 1 MDCK. Линия 1 MDCK представлена уплощенными клетками, формирующими функционально плотный эпителий с высоким трансэпителиальным сопротивлением (Barker, Simmons, 1981; Richardson et al., 1981).

Далее в нашей работе мы подтвердили, что АВП эффективно связывается с поверхностью клеток MDCK. Это связывание носит характер специфического лиганд-рецепторного взаимодействия, поскольку, во-первых, АВП не был обнаружен нами в негативном контроле — на поверхности инкубированных в АВП клеток HeLa, не экспрессирующих рецепторы к вазопрессину. Во-вторых, через 15 мин инкубации клеток MDCK с АВП происходит его исчезновение с базолатеральной клеточной поверхности, что объясняется, по нашему мнению, интернализацией лиганд-рецепторных комплексов. Это наблюдение совпадает с опубликованными в литературе результатами, полученными на клетках MDCK, трансфицированных V2-GFP-рецептором, согласно которым воздействие 10^{-6} М АВП в течение 1 ч приводит к интернализации более 85 % всех V2-GFP-рецепторов с клеточной поверхности (Robben et al., 2004).

Таким образом, мы получили подтверждение тому, что имеющиеся в нашем распоряжении клетки MDCK могут быть использованы в качестве адекватного объекта для исследования клеточных механизмов действия АВП.

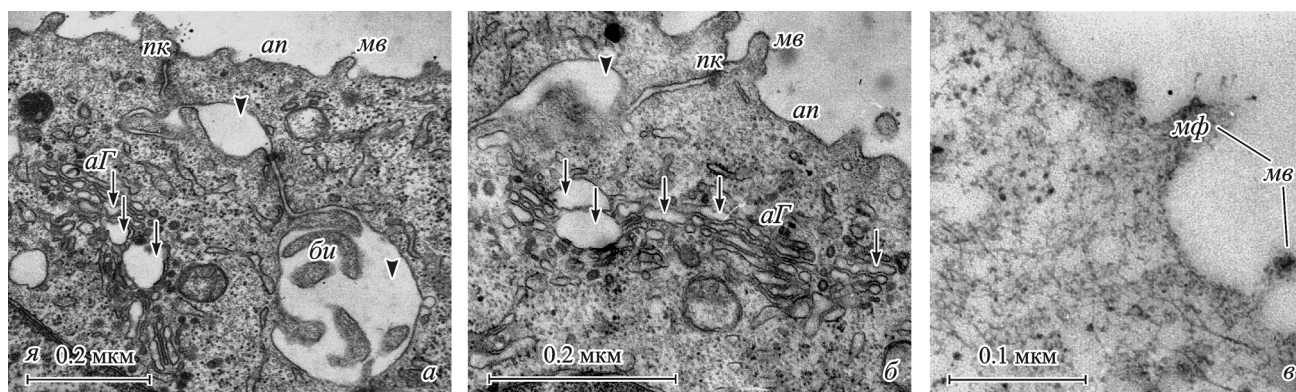


Рис. 6. Изменения ультраструктуры клеток MDCK при воздействии АВП.

а, б — фрагментация аппарата Гольджи, набухание цистерн Гольджи и расширение межклеточных щелей; стрелки показывают набухшие цистерны аппарата Гольджи, головки стрелок — расширенные межклеточные щели. в — уменьшение плотности слоя апикального субмембранного актина. Обозначения те же, что на рис. 1 и 2.

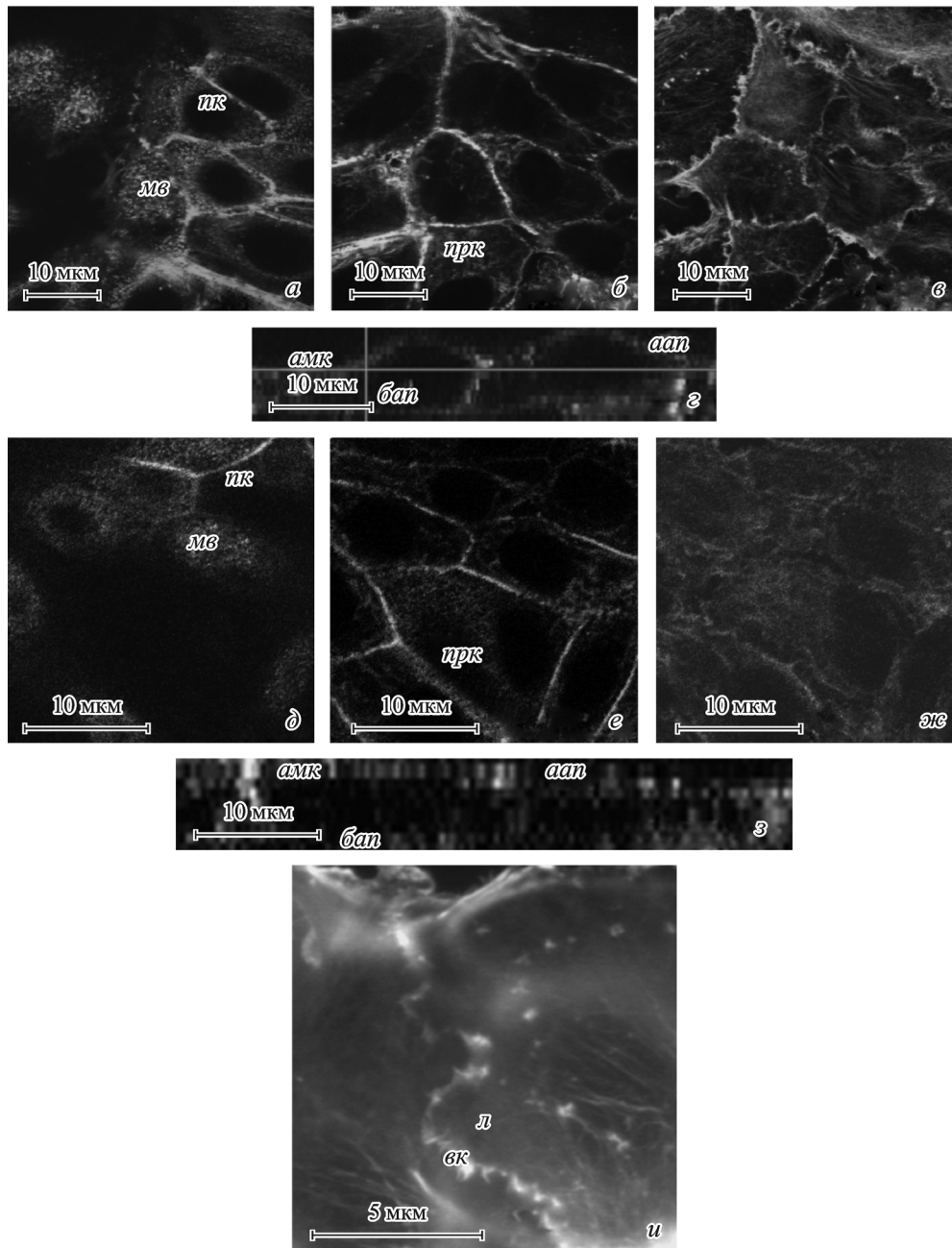


Рис. 7. Визуализация актина родамин-фalloидином в клетках MDCK в условиях воздействия АВП (*a—z*) или форсколина (*д—z*). *a—в, д—ж* — горизонтальные оптические срезы клеток, полученные в конфокальном микроскопе на уровне их апикальной (*a, д*), средней (*б, е*) и базальной (*в, ж*) цитоплазмы. *a, д* — актин выявляется в микроворсинках (*мв*) и в области плотных контактов (*лк*); субмембранная апикальная сеть деполимеризована (ср. с рис. 3, *a*). *б, е* — актин выявляется в области промежуточных контактов (*прк*). *в, ж* — актин в стресс-фибриллах значительно деполимеризован (ср. с рис. 3, *в*). *z, z* — вертикальные срезы (в плоскости XZ) через монослои MDCK, реконструированные из серий горизонтальных оптических срезов. Прослеживается деполимеризация апикального пула и базального пула микрофиламентов при сохранении актина, ассоциированного с межклеточными контактами (ср. с рис. 3, *z*). *u* — ламеллоподия, образованная клеткой в составе монослоя в условиях воздействия АВП (флуоресцентная микроскопия). Сохраняется флуоресценция актина в области ведущего края (ср. с рис. 3, *д*). Обозначения те же, что и на рис. 3.

Проведенный нами морфологический анализ выявил, что воздействие АВП вызывает заметную реорганизацию ультраструктуры клеток MDCK, наибольшие изменения при этом претерпевают аппарат Гольджи и актиновый цитоскелет клеток.

В условиях воздействия АВП мы обнаружили заметную фрагментацию аппарата Гольджи. Цистерны аппарата Гольджи при этом значительно увеличиваются в объеме, заполняясь электронно-прозрачным содержимым. От-

мечено также расширение межклеточных щелей в эпителии. По нашему мнению, причиной указанных изменений в условиях воздействия АВП является поступление воды в цитоплазму клеток и в базолатеральные межклеточные щели. Уже в первых работах на клетках MDCK было продемонстрировано, что монослой MDCK способен осуществлять транспорт жидкости с апикальной на базальную поверхность (Leighton et al., 1969; Misfeldt et al., 1976). Морфологически этот транспорт выражается в формиро-

вании блистеров — заполненных жидкостью куполообразных участков монослоя, локально отходящих от субстрата. Воздействие АВП усиливает трансэпителиальный транспорт жидкости и существенно повышает интенсивность формирования блистеров культурой MDCK (Lever, 1979). В ранних работах установлено также, что движущей силой для возникновения водного потока через монослой MDCK является АВП-индуцированный ток ионов натрия в апикально-базальном направлении (Saier, 1981; Simmons, 1982). Позднее было выяснено, что в клетках MDCK, как и в других плотных АВП-чувствительных эпителиях, вазопрессин активирует реабсорбцию натрия через амилорид-чувствительные натриевые каналы в апикальной мембране (Schaffer, Hawk, 1992; Blazer-Yost et al., 1996; Lahr et al., 2000) при его последующем выбросе из клеток Na^+ , K^+ -АТФазой через базолатеральную мембрану (Kennedy, Lever, 1984; Reznik et al., 1985). Следовательно, хотя в нашей работе мы экспериментально не создавали трансэпителиальный осмотический градиент, он возникает самопроизвольно в результате АВП-индуцированной реабсорбции ионов натрия. Несмотря на отсутствие заметного уровня экспрессии AQP2 в клетках MDCK (Furuno et al., 1996), водная проницаемость их апикальной мембраны, тем не менее, достаточна для отмеченного нами поступления воды в цистерны аппарата Гольджи и межклеточные щели по осмотическому градиенту. В монослое MDCK, как и в других исследованиях АВП-чувствительных плотных эпителиях, водный поток, очевидно, осуществляется трансцеллюлярно. Об этом свидетельствуют имеющиеся в литературе данные о крайне низкой, близкой к нулю водной проницаемости плотных контактов между клетками MDCK (Kovbasnjuk et al., 1998). Эти данные были получены авторами с помощью наблюдения за введенными в латеральные межклеточные щели флуоресцентными маркерами.

В связи с организацией апикальной мембраны клеток MDCK большой интерес представляют опубликованные результаты исследований с использованием прижизненного флуоресцентного мечения липидов (Giocondi et al., 1990). Авторы работы отметили АВП-зависимые изменения в организации липидного бислоя и увеличение «текучести» апикальной мембраны клеток MDCK. В работе нашей лаборатории, выполненной на мочевом пузыре амфибий, также было отмечено изменение организации липидного бислоя апикальной мембраны эпителиоцитов. Мы обнаружили перераспределение холестерина между монослоями мембраны при воздействии АВП (Кевер и др., 1988). В целом, по-видимому, эти АВП-зависимые изменения физико-химических свойств апикальной мембраны существенны для ее водной проницаемости. В собирательных трубках почки они, очевидно, вносят свой вклад в появление трансэпителиального водного потока наряду с транслокацией AQP2.

Нужно отметить, что АВП-индуцированные структурные изменения аппарата Гольджи, сходные с описанными в настоящем исследовании, были ранее охарактеризованы в наших работах, выполненных на другом вазопрессин-чувствительном эпителии — мочевом пузыре амфибий (Снигиревская, Комиссарчик, 1988; Komissarchik et al., 1998; Snigirevskaya, Komissarchik, 2000). В своем крайнем выражении, при больших величинах трансэпителиального водного потока, реорганизация аппарата Гольджи клеток мочевого пузыря амфибий приводит к возникновению огромных вакуолей, содержащих воду и заполняющих значительный объем цитоплазмы

(Komissarchik et al., 1985; Komissarchik, Snigirevskaya, 2002). Таким образом, в условиях воздействия АВП наблюдаются сходные ультраструктурные изменения аппарата Гольджи в двух АВП-чувствительных эпителиях, что, очевидно, вызвано функциональной необходимостью эффективной внутриклеточной осморегуляции в обоих случаях.

С помощью использования двух методических подходов — электронной микроскопии и мечения актина родамин-фаллоидином — мы впервые установили, что воздействие АВП вызывает существенную деполимеризацию актинового цитоскелета клеток MDCK. Данная АВП-чувствительная клеточная линия до настоящего времени не изучалась в этом отношении, хотя на нескольких других АВП-чувствительных эпителиях *in vivo* и *in vitro* были получены сходные результаты (Ding et al., 1991; Hays et al., 1993; Simon et al., 1993; Горшков, Комиссарчик, 1997; Klusmann et al., 2001).

Согласно принятой точке зрения, функциональная роль деполимеризации актина в клетках вазопрессин-чувствительных эпителиев при воздействии АВП состоит в облегчении физического контакта цитоплазматических везикул, несущих водные каналы в своей мембране, с апикальной плазматической мембраной. Актиновый цитоскелет эпителиоцитов, в особенности его апикальный субмембранный компонент, рассматривается как механический барьер, препятствующий слиянию мембран везикул — цитоплазматических депо водных каналов — с апикальной мембраной (Hays et al., 1993; Комиссарчик и др., 1996). В дополнение к барьерной функции предполагается также, что актин может играть и активную роль в процессах транспорта и(или) встраивания водных каналов в плазматическую мембрану (Noda, Sasaki, 2007). Согласно недавно опубликованным данным, AQP2 ассоциирован с мультибелковым моторным комплексом, в составе которого идентифицированы актин, легкая цепь миозина, альфа-актинин, гельзолин и ряд других актин-связывающих белков (Noda et al., 2005). Известно также, что индуцированная вазопрессином реорганизация апикального субмембранного актина в клетках CD8, полученных из собирательных трубок почки кролика, происходит с участием линкерных белков семейства ERM (эзрин-радиксин-моззин) (Tamma et al., 2005).

Каким именно образом запускаемый V2-рецепторами внутриклеточный сигналинг приводит к реорганизации актинового цитоскелета клеток АВП-чувствительных эпителиев, во многом остается невыясненным. По опубликованным данным, в клетках других типов активированная ПКА фосфорилирует по серину 188 малую ГТФазу Rho, тем самым ингибируя ее активность (Forget et al., 2002). Как известно, активная ГТФ-связанная Rho является одним из ключевых регуляторов полимеризации актина, главным образом сборки стресс-фибрилл в клетке, в то время как подавление ее активности приводит к деполимеризации стресс-фибрилл (Ridley, Hall, 1992). Установлено, что в вазопрессин-чувствительных клетках линии CD8 действительно наблюдается снижение уровня активности Rho при воздействии на них форсколина (Tamma et al., 2003). Таким образом, идея о существовании вышеописанного пути внутриклеточной сигнализации при проведении сигнала от V2-рецепторов на актиновый цитоскелет вазопрессин-чувствительных клеток вполне обоснованна.

Косвенным подтверждением вышеупомянутого предположения является наше наблюдение, касающееся со-

хранения формирования ламеллоподий клетками MDCK при воздействии на них вазопрессина. Формирование ламеллоподий находится под контролем другой малой ГТФазы — Ras (Ridley et al., 1992), имеющей другие факторы активации и мишени действия, чем Rho. Очевидно, в условиях воздействия вазопрессина активированная ПКА фосфорилирует Rho, ингибируя ее активность, и в то же время не оказывает действия на Ras. В результате этого клетки теряют значительную часть стресс-фибрилл, но сохраняют способность к формированию ламеллоподий.

При анализе реорганизации актинового цитоскелета клеток MDCK мы использовали для воздействия на клетки два агента: АВП и активатор аденилат-циклазы форсколин. В обоих случаях были получены принципиально сходные результаты, хотя воздействие форсколина вызывает значительно более глубокую деполимеризацию актина, чем воздействие АВП. Наблюдаемое количественное различие в уровне деполимеризации актина связано, очевидно, с тем, что форсколин активирует аденилат-циклазу напрямую, путем непосредственного связывания с ней (Seamon, Daly, 1981), в то время как клеточное действие АВП опосредуется V2-рецепторами и стимулирующим G-белком. Это неизбежно накладывает ограничения, связанные с уровнем экспрессии V2-рецепторов клетками, а также с возможностью доступа молекул АВП к рецепторам в клеточном моноосе.

Таким образом, полученные нами результаты говорят об АВП-индуцированных изменениях в аппарате Гольджи клеток MDCK, связанных с появлением водного потока через их цитоплазму, и о существенной деполимеризации актинового цитоскелета клеток в условиях воздействия АВП.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-48281).

Список литературы

- Гориков А. Н., Комиссарчик Я. Ю. 1997. Структурные перестройки микрофиламентов в гранулярных клетках мочевого пузыря лягушки при индукции водного транспорта: флуоресцентно-микроскопическое, иммуноцитохимическое и электронно-микроскопическое исследование. Цитология. 39 (11): 1032—1037.
- Кевер Л. В., Комиссарчик Я. Ю., Королев Е. В. 1988. Локализация холестерина в мембранах гранулярных клеток эпителия мочевого пузыря лягушки при стимулированном транспорте воды. Цитология. 30 (5): 524—531.
- Комиссарчик Я. Ю., Макаренкова Е. И., Снигиревская Е. С., Шахматова Е. И., Брудная М. С., Наточин Ю. В. 1996. Исследование ультраструктуры апикального цитоскелета клеток эпителия мочевого пузыря лягушки при АДГ-зависимом и АДГ-независимом увеличении водной проницаемости. Цитология. 38 (9): 927—933.
- Наточин Ю. В. 1994. Молекулярная физиология почки и механизмы интеграции ее функций. Физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 80 (7): 42—54.
- Снигиревская Е. С., Комиссарчик Я. Ю. 1988. Перестройка аппарата Гольджи эпителиальных клеток мочевого пузыря лягушки при стимуляции транспорта воды антидиуретическим гормоном. Цитология. 30 (2): 163—169.
- Снигиревская Е. С., Комиссарчик Я. Ю. 1999. Аквапорины плазматических мембран эпителиальных клеток. Цитология. 41 (10): 864—870.
- Arthur J. 2000. The MDCK cell line is made up of populations of cells with diverse resistive and transport properties. Tissue Cell. 32: 446—450.

Barker G., Simmons N. 1981. Identification of two strains of cultured canine renal epithelial cells (MDCK cells) which display entirely different physiological properties. Quart. J. Exp. Physiol. 66: 61—72.

Blazer-Yost B., Record R., Oberleithner H. 1996. Characterization of hormone-stimulated Na⁺ transport in a high-resistance clone of the MDCK cell line. Pflugers Arch. 432: 685—691.

Brown D. 2003. The ins and outs of aquaporin-2 trafficking. Amer. J. Physiol. 284: F893—F901.

Deen P., Rijss J., Mulders S., Errington R., van Baal J., van Os C. 1997. Aquaporin-2 transfection of Madin—Darby canine kidney cells reconstitutes vasopressin-regulated transcellular osmotic water transport. J. Amer. Soc. Nephrol. 8: 1493—1501.

Ding G., Franki N., Condeelis J., Hays R. 1991. Vasopressin depolymerizes F-actin in toad bladder epithelial cells. Amer. J. Physiol. 260: C9—C16.

Ehnis T., Hocher B., Abou-Rebyeh H., Oelkers W., Hensen J. 1993. Expression of vasopressin receptors (V2-subtype) on LLC-PK1 cells during cell culture. Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 31: 273—276.

Forget M., Desrosiers R., Gingras D., Beliveau R. 2002. Phosphorylation states of Cdc42 and RhoA regulate their interactions with Rho GDP dissociation inhibitor and their extraction from biological membranes. Biochem. J. 361: 243—254.

Furuno M., Uchida S., Marumo F., Sasaki S. 1996. Repressive regulation of the aquaporin-2 gene. Amer. J. Physiol. 271: F854—F860.

Fushimi K., Sasaki S., Marumo F. 1997. Phosphorylation of serine 256 is required for cAMP-dependent regulatory exocytosis of the aquaporin-2 water channel. J. Biol. Chem. 272: 14 800—14 804.

Giocondi M., Friedlander G., Le Grimellec C. 1990. ADH modulates plasma membrane lipid order of living MDCK cells via cAMP-dependent process. Amer. J. Physiol. 259: F95—F103.

Gustafson C., Levine S., Katsura T., McLaughlin M., Aleixo M., Tamarappoo B., Verkman A., Brown D. 1998. Vasopressin regulated trafficking of a green fluorescent protein-aquaporin 2 chimera in LLC-PK1 cells. Histochem. Cell Biol. 110: 377—386.

Handler J., Perkins F., Johnson J. 1980. Studies of renal cell function using cell culture techniques. Amer. J. Physiol. 238: F1—F9.

Hays R., Condeelis J., Gao Y., Simon H., Ding G., Franki N. 1993. The effect of the vasopressin of the cytoskeleton of the epithelial cell. Pediatr. Nephrol. 7: 672—679.

Hull R., Cherry W., Weaver J. 1976. The origin and characteristics of a pig kidney cell strain, LLC-PK. In vitro. 12: 670—677.

Katsura T., Gustafson C., Ausiello D., Brown D. 1997. Protein kinase A phosphorylation is involved in regulated exocytosis of aquaporin-2 in transfected LLC-PK1 cells. Amer. J. Physiol. 272: F817—F822.

Katsura T., Verbavatz J., Farinas J., Ma T., Ausiello D., Verkman A., Brown D. 1995. Constitutive and regulated membrane expression of aquaporin 1 and aquaporin 2 water channels in stably transfected LLC-PK1 epithelial cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 92: 7212—7216.

Kennedy B., Lever J. 1984. Regulation of Na⁺, K⁺-ATPase activity in MDCK kidney epithelial cell cultures: role of growth state, cyclic AMP, and chemical inducers of dome formation and differentiation. J. Cell. Physiol. 121: 51—63.

Klussmann E., Maric K., Rosenthal W. 2000. The mechanisms of aquaporin control in the renal collecting duct. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 141: 33—95.

Klussmann E., Tamma G., Lorenz D., Wiesner B., Maric K., Hofmann F., Aktories K., Valenti G., Rosenthal W. 2001. An inhibitory role of Rho in the vasopressin-mediated translocation of aquaporin-2 into cell membranes of renal principal cells. J. Biol. Chem. 276: 20 451—20 457.

Komissarchik Y., Natochin Y., Snigirevskaya E., Shakhmatova E. 1985. Specific vacuolation of frog urinary bladder granular cell after ADH stimulation of water transport. Gen. Physiol. Biophys. 4: 557—572.

- Komissarchik Y., Snigirevskaya E. 2002. Giant vacuoles arising during ADH-induced transcellular bulk water flow across the epithelium of the frog urinary bladder. *Cell Biol. Int.* 26 : 873—883.
- Komissarchik Y., Snigirevskaya E., Shakhmatova E., Natochin Y. 1998. Ultrastructural correlates of the antidiuretic hormone-dependent and antidiuretic hormone-independent increase of osmotic water permeability in the frog urinary bladder epithelium. *Cell Tissue Res.* 293 : 517—524.
- Kovbasnjuk O., Leader J., Weinstein A., Spring K. 1998. Water does not flow across the tight junctions of MDCK cell epithelium. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 95 : 6526—6530.
- Kreisberg J., Wilson P. 1988. Renal cell culture. *J. Electron Microscop.* 9 : 235—263.
- Lahr T., Record R., Hoover D., Hughes C., Blazer-Yost B. 2000. Characterization of the ion transport responses to ADH in the MDCK-C7 cell line. *Pflugers Arch.* 439 : 610—617.
- Leighton J., Brada Z., Estes L., Justh G. 1969. Secretory activity and oncogenicity of a cell line (MDCK) derived from canine kidney. *Science* 163 : 472—473.
- Lever J. 1979. Regulation of dome formation in differentiated epithelial cell cultures. *J. Supramol. Struct.* 12 : 259—272.
- Marples D., Knepper M., Christensen E., Nielsen S. 1995. Redistribution of aquaporin-2 water channels induced by vasopressin in rat kidney inner medullary collecting duct. *Amer. J. Physiol.* 269 : C655—C664.
- Matsuzaki T., Suzuki T., Takata K. 2001. Hypertonicity-induced expression of aquaporin 3 in MDCK cells. *Amer. J. Physiol.* 281 : C55—C63.
- Meier K., Snavely M., Brown S., Brown J., Insel P. 1983. α_1 - and β_2 -adrenergic receptor expression in the Madin—Darby Canine Kidney epithelial cell line. *J. Cell Biol.* 97 : 405—415.
- Misfeldt D., Hamamoto S., Pitelka D. 1976. Transepithelial transport in cell culture. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 73 : 1212—1216.
- Mita S., Takeda K., Nakane M., Yasuda H., Kawashima K., Yamada M., Endo H. 1980. Response of a dog kidney cell line (MDCK) to antidiuretic hormone (ADH) with special reference to activation of protein kinase. *Exp. Cell Res.* 130 : 169—173.
- Nakazato Y., Suzuki H., Saruta T. 1989. Characterization of subclones of Madin—Darby Canine Kidney renal epithelial cell line. *Biochim. biophys. acta.* 1014 : 57—65.
- Nielsen S., Chou C., Marples D., Christensen E., Kishore B., Knepper M. 1995. Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 92 : 1013—1017.
- Nielsen S., DiGiovanni S., Christensen E., Knepper M., Harris H. 1993. Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin-regulated water channel in rat kidney. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 90 : 11 663—11 667.
- Nielsen S., Frokiaer J., Marples D., Kwon T., Agre P., Knepper M. 2002. Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol. Rev.* 82 : 205—244.
- Noda Y., Horikawa S., Katayama Y., Sasaki S. 2005. Identification of a multiprotein «motor» complex binding to water channel aquaporin-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330 : 1041—1047.
- Noda Y., Sasaki S. 2005. Trafficking mechanism of water channel aquaporin-2. *Biol. Cell.* 97 : 885—892.
- Noda Y., Sasaki S. 2008. The role of actin remodeling in the trafficking of intracellular vesicles, transporters, and channels: focusing on aquaporin-2. *Pflugers Arch.* 456 : 737—745.
- Parisi M., Pisam M., Merot J., Chevalier J., Bourguet J. 1985. The role of microtubules and microfilaments in the hydroosmotic response to antidiuretic hormone. *Biochim. biophys. acta.* 817 : 333—342.
- Pearl M., Taylor A. 1985. Role of the cytoskeleton in the control of transcellular water flow by vasopressin in amphibian urinary bladder. *Biol. Cell.* 55 : 163—172.
- Reznik V., Shapiro R., Mendoza S. 1985. Vasopressin stimulates DNA synthesis and ion transport in quiescent epithelial cells. *Amer. J. Physiol.* 249 : C267—C270.
- Richardson J., Scalera V., Simmons N. 1981. Identification of two strains of MDCK cells which resemble separate nephron tubule segments. *Biochim. biophys. acta.* 673 : 26—36.
- Ridley A., Hall A. 1992. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell.* 70 : 389—399.
- Ridley A., Paterson H., Johnston C., Diekmann D., Hall A. 1992. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell.* 70 : 401—410.
- Rindler M., Chuman L., Shaffer L., Saier M. 1979. Retention of differentiated properties in an established dog kidney epithelial cell line (MDCK). *J. Cell Biol.* 81 : 635—648.
- Robben J., Knoers N., Deen P. 2004. Regulation of the vasopressin V2 receptor by vasopressin in polarized renal collecting duct cells. *Mol. Biol. Cell.* 15 : 5693—5699.
- Saier M. 1981. Growth and differentiated properties of a kidney epithelial cell line (MDCK). *Amer. J. Physiol.* 240 : C106—C109.
- Schafer J., Hawk C. 1992. Regulation of Na⁺ channels in the cortical collecting duct by AVP and mineralocorticoids. *Kidney Int.* 41 : 255—268.
- Seamon K., Daly J. 1981. Forskolin: a unique diterpene activator of cyclic AMP-generating systems. *J. Cyclic Nucleotide Res.* 7 : 201—224.
- Simmons N. 1982. Cultured monolayers of MDCK cells: a novel model for the study of epithelial development and function. *Gen. Pharmacol.* 13 : 287—291.
- Simon H., Gao Y., Franki N., Hays R. 1993. Vasopressin depolymerizes apical F-actin in rat inner medullary collecting duct. *Amer. J. Physiol.* 265 : C757—C762.
- Skorecki K., Brown D., Ercolani L., Ausiello D. 1992. Molecular mechanisms of vasopressin action in the kidney. In: *Handbook of physiology. Sect. 8: Renal Physiology* (Ed. Windhager E.). New York; Oxford. 1185—1218.
- Snigirevskaya E., Komissarchik Y. 2000. Structural correlates of the transepithelial water transport. *Intern. Rev. Cytol.* 198 : 203—275.
- Strewler G. 1984. Release of cAMP from a renal epithelial cell line. *Amer. J. Physiol.* 246 : C224—C230.
- Tajika Y., Matsuzaki T., Suzuki T., Aoki T., Hagiwara H., Kuwahara M., Sasaki S., Takata K. 2004. Aquaporin-2 is retrieved to the apical storage compartment via early endosomes and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Endocrinology.* 145 : 4375—4383.
- Tamma G., Klussmann E., Maric K., Aktories K., Svelto M., Rosenthal W., Valenti G. 2001. Rho inhibits cAMP-induced translocation of aquaporin-2 into the apical membrane of renal cells. *Amer. J. Physiol.* 281 : F1092—F1101.
- Tamma G., Klussmann E., Oehlke J., Krause E., Rosenthal W., Svelto M., Valenti G. 2005. Actin remodeling requires ERM function to facilitate AQP2 apical targeting. *J. Cell Sci.* 118 : 3623—3630.
- Tamma G., Klussmann E., Procino G., Svelto M., Rosenthal W., Valenti G. 2003. cAMP-induced AQP2 translocation is associated with RhoA inhibition through RhoA phosphorylation and interaction with RhoGDI. *J. Cell Sci.* 116 : 1519—1525.
- Wade J., Kachadorian W. 1988. Cytochalasin B inhibition of toad bladder apical membrane responses to ADH. *Amer. J. Physiol.* 255 : C526—C530.

ARGININ-VASOPRESSIN-INDUCED ALTERATIONS IN THE STRUCTURE OF MDCK CELLS

A. N. Gorshkov,¹ E. S. Snigirevskaya, Ya. Yu. Komissarchik

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

¹ e-mail: angorsh@yahoo.com.

Alterations in the structural organization of MDCK cells under arginin-vasopressin (AVP) action were studied by electron and fluorescent microscopy. Electron-microscopical evidence was obtained that MDCK cells within monolayer form structurally distinct apical and basolateral surfaces separated by well-developed intercellular contact zones. It was proved that AVP specifically bound to the receptors on the basolateral surface of the cells, and was internalized from the surface in 10—15 min. AVP action resulted in fragmentation of Golgi apparatus and swelling of Golgi cisterns caused by initiation of osmotic water flow across the monolayer. Significant depolymerization of cells actin cytoskeleton was revealed under AVP or forskolin (an adenylate cyclase activator) exposure. Functional role and regulatory mechanisms of described structural alterations are discussed.

Key words: arginin-vasopressin, water transport, MDCK cells, actin cytoskeleton.