

## ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ И СООБЩЕНИЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫХ НА ШКОЛЕ-СЕМИНАРЕ ПО ПРОБЛЕМАМ ОРГАНИЗАЦИИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ТРАНСПОРТА, ЦИТОСКЕЛЕТА И ПУТЕЙ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА

(Санкт-Петербург, Институт цитологии РАН, 17—18 ноября 2009 г.)

ФОРМИРОВАНИЕ, ОРГАНИЗАЦИЯ И РЕГУЛЯЦИЯ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ АДГЕЗИОННЫХ КОНТАКТОВ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК И ФИБРОБЛАСТОВ. © Д. В. Айолло, Н. А. Глушанкова. НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва, [specularium@mail.ru](mailto:specularium@mail.ru).

Межклеточные кадгеринсодержащие адгезионные контакты (АК) необходимы для нормального формирования тканей и поддержания их целостности. Инвазия и метастазирование опухолевых клеток часто ассоциируются с разрушением АК. С помощью флуоресцентной микроскопии нами были исследованы АК нормальных эпителиоцитов IAR-2, трансформированных эпителиоцитов IAR-6-1 и фибробластов Rat-1. Для нормальных эпителиоцитов были характерны тангенциальные АК, располагавшиеся вдоль клеточных границ в виде непрерывных линий и ассоциировавшиеся с актиновым адгезионным поясом. Фибробласты и трансформированные эпителиоциты формировали другой тип АК — радиальные АК, которые представляли собой отдельные штрихи, ориентированные перпендикулярно клеточной границе и связанные с прямыми актиновыми пучками. Видеомикроскопическое исследование нормальных эпителиоцитов, экспрессирующих GFP-Е-кадгерин, показало, что формирование тангенциальных АК происходит за счет латерального расширения инициальных точечных контактов. Образование стабильного контакта между нормальными эпителиоцитами приводило к разрушению краевого актинового пучка в зоне контакта. Оставшиеся части краевых пучков формировали аркоподобные структуры, натяжение которых приводило к контактному параличу в зоне контакта двух клеток. Начальные точечные АК фибробластов и трансформированных эпителиоцитов увеличивали свой линейный размер и превращались в радиальные штрихи. При этом ни у фибробластов, ни у трансформированных эпителиоцитов не наблюдался контактный паралич, что связано с изменением характера натяжения в зоне контакта, вызванным отсутствием периферического актинового пучка. Для образования обоих типов АК требовалась активность малой ГТФазы Rho. Помимо этого, формирование тангенциальных АК зависело от активности малой ГТФазы Rac1 и форма mDia1 и не зависело от контрактильности актомиозина и активности ROCK. Напротив, формирование радиальных АК зависело от контрактильности актомиозина и активности ROCK и не зависело от

активности малой ГТФазы Rac1 и форма mDia1. Таким образом, основным фактором, определяющим пространственную организацию АК нормальных и трансформированных эпителиоцитов и фибробластов, является общая организация актинового цитоскелета.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-49214а).

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДИНАМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК СВЯЗАННЫХ С ЦЕНТРОСОМОЙ И СВОБОДНЫХ МИКРОТРУБОЧЕК ВО ВНУТРЕННЕЙ ЦИТОПЛАЗМЕ ФИБРОБЛАСТОВ. © И. Б. Алиева,<sup>1</sup> Т. Л. Березинская,<sup>1</sup> Г. Г. Бориси,<sup>2</sup> И. А. Воробьев.<sup>1</sup> <sup>1</sup>НИИ ФХБ им. А. Н. Белозерского МГУ им. М. В. Ломоносова, <sup>2</sup>Северо-западный университет, Чикаго, США.

Согласно традиционным представлениям, микротрубочки (МТ) в фибробластоподобных клетках образуют в клетке радиальную систему: их минус-концы закреплены на центросоме, расположенной около ядра, а плюс-концы растут процессивно через всю клетку (Komarova et al., 2002, J. Cell Sci., 115 : 3527—3539). Однако данной схеме противоречат следующие наблюдения: рост МТ вблизи центросомы происходит не строго радиально (Алиева и др., 2008, Цитология, 50 (11) : 936—946), и вокруг центросомы с помощью электронной микроскопии были описаны многочисленные короткие МТ (Sato et al., 1981, Tohoku J. Exp. Med., 134 : 311—319; Алиева, Воробьев, 1997, Биол. мембраны, 14 (1) : 18—28). Для разрешения данных противоречий в настоящем исследовании мы предприняли детальный анализ динамики МТ вблизи центросомы. Были использованы культуры клеток 3Т3 и REF, инъецированные флуоресцентно меченным тубулином, и клетки 3Т3, трансфицированные EB1-GFP. При этом применили два подхода: обесцвечивание области центросомы с помощью лазерного облучения (Komarova et al., 2002, J. Cell Sci., 115 : 3527—3539) и анализ последовательных вычтенных кадров (Vorobjev et al., 1999, J. Cell Sci., 112 : 2277—2289). Выделив МТ, растущие непосредственно от центросомы, и не связанные с центросомой МТ, мы сравнили их поведение. При этом мы постарались проследить за динамикой МТ от начала роста на центросоме до полной деполимеризации. В результате

исследований было обнаружено: 1. Более половины МТ, растущих от centrosомы, имеют короткое время существования: продолжительность их роста не превышает 9 с, после чего они без паузы разбираются до нуля с плюско-конца. Средняя длина таких МТ составляет  $1.8 \pm 0.8$  мкм. 2. Динамические характеристики относительно длинных МТ, растущих от centrosомы, и свободных МТ различны: продолжительность периода процессивного роста свободных МТ больше соответствующего периода роста centrosомных МТ, соответственно средняя длина полимеризующихся фрагментов свободных МТ в 1.7 раза превышает среднюю длину centrosомных МТ. Процессивный рост centrosомных МТ не возобновляется после первого эпизода деполимеризации. Свободные МТ, если не успевают разобратся до нуля, нередко возвращаются к процессивному росту. Средняя скорость роста centrosомных и свободных МТ одинакова, однако скорости их деполимеризации достоверно различаются ( $43.0 \pm 17.7$  для centrosомных и  $56.3 \pm 14.6$  для свободных). 3. Процессивный рост всех centrosомных МТ ограничен: большинство МТ переходит к деполимеризации, не достигая края клетки, и вероятность их полной деполимеризации экспоненциально возрастает со временем. Таким образом, в фибробластах от centrosомы растут сравнительно короткие МТ, которые отличаются по своим свойствам от свободных МТ. Мы полагаем, что формирование радиальной системы МТ, выраженной во многих клетках, обусловлено главным образом радиальной организацией МТ, не ассоциированных с centrosомой.

**БЕЛКИ ТЕПЛОВОГО ШОКА 70 И 90 ВХОДЯТ В СОСТАВ КОМПЛЕКСОВ, СОДЕРЖАЩИХ Р65-СУБЪЕДИНИЦУ ФАКТОРА NF-κB И БЕЛКИ ЦИТОСКЕЛЕТА В КЛЕТКАХ A431.** © Д. Е. Бобков, А. А. Айзенштадт, И. В. Кропачева, Г. П. Пинаев. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Тропомиозин является актинсвязывающим белком, функциями которого, по современным представлениям, являются поддержание структуры актиновых микрофиламентов в мышечных и немышечных клетках и регуляция сократительного процесса. В немышечных клетках млекопитающих тропомиозины кодируются четырьмя генами и образуют обширное семейство изоформ при участии альтернативного сплайсинга. Выделяют два семейства белков — высокомолекулярные тропомиозины (НМВ) с мол. массой 35—40 кДа, к которым относятся 1, 2 и 3 изоформы, и низкомолекулярные (ЛМВ) — тропомиозины 4 и 5 с мол. массой 27—32 кДа. Молекулы тропомиозинов образуют палочковидные димеры, содержащие от 5 до 7 актинсвязывающих сайтов, которые укладываются в канавки по обеим сторонам спирали F-актина и обеспечивают филаментам структурную стабильность. Обычно тропомиозин выявляется в клетке в связанном с актиновыми структурами виде. Вместе с тем при иммунофлуоресцентном анализе цитоскелета с помощью антител к тропомиозину он обнаруживается не только на актиновых структурах, но и в виде независимых от него крупных частиц, распределенных в цитозоле. Состав этих частиц неизвестен, так же как и их роль в жизнедеятельности клеток и в процессах реорганизации цитоскелета. Вполне возможно, что эти частицы представляют собой предшественники будущих актиновых структур, образующихся в процессе реорганизации цитоскелета при проведении внутрикле-

точного сигнала. В связи с этим задачей настоящей работы являлось выделение и анализ белкового состава обнаруживаемых частиц. При выделении белков цитоскелета обычными биохимическими методами клеточные структуры полностью разрушают и затем экстрагируют соответствующими буферами. Для выполнения поставленной задачи такой подход не годится, так как при полном разрушении клеток и последующих процедурах, включающих в себя центрифугирование и промывание осадков, частицы могут разрушаться. Поэтому был разработан новый оригинальный метод выделения, позволяющий сохранить целостность выделяемых частиц без нарушения структур цитоскелета. Для быстрой экстракции цитозольных белков был использован лизирующий SF-буфер, сохраняющий соотношение между мономерными и полимерными формами актина. Полученные экстракты были разделены методом гель-фильтрации на колонке Superose 6 с последующим электрофорезом, который показал, что во фракциях, соответствующих мол. массе 400—800 кДа, содержатся мультимолекулярные белковые комплексы. Вестерн-блот подтвердил исходное предположение о том, что в этих комплексах находятся изоформы тропомиозина. Из этих фракций была проведена иммунопреципитация моноклональными антителами против НМВ изоформ тропомиозинов и обнаружено, что в составе частиц выделяются помимо тропомиозинов и другие белки. Методом масс-спектрометрии удалось идентифицировать среди этих белков белок теплового шока 90 в составе частиц мол. массой 400—500 кДа и тяжелую цепь немышечного миозина 9 в составе частиц мол. массой 550—650 кДа. При этом большая часть тропомиозинов входит в состав частиц мол. массой 400—500 кДа в комплексе с БТШ90, а в комплексе с миозином 9 выявляется меньшая часть тропомиозинов. Таким образом, проведенные исследования показали, что тропомиозиновые частицы действительно представляют собой белковые комплексы с высокой молекулярной массой, включающие в себя как цитоскелетные белки, так и молекулы другой природы. Дальнейший анализ белков, входящих в состав этих частиц, позволит выяснить их функцию.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта президента Российской Федерации по поддержке ведущих научных школ (НШ-7852.2006.4).

**ВЫДЕЛЕНИЕ И АНАЛИЗ БЕЛКОВОГО СОСТАВА ТРОПОМИОЗИНОВЫХ ЧАСТИЦ, СОДЕРЖАЩИХСЯ В ЦИТОЗОЛЕ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ КРЫСЫ.** © Д. Е. Бобков, А. А. Айзенштадт, И. В. Кропачева, Г. П. Пинаев. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

NF-κB является быстроиндуцибельным транскрипционным фактором, активность которого меняется в ответ на большое число стимулов у ряда клеток. Ранее было обнаружено, что NF-κB солокализуется с актиновыми структурами, стресс-фибриллами и фокальными контактами, а также солокализуется в цитоплазме и совместно перераспределяется в ядро с актинсвязывающим белком альфа-актинином-4. Ранее методами гель-фильтрации и перекрестной иммунопреципитации нами было установлено, что в цитоплазме клеток линии A431 актинсвязывающий белок альфа-актинин-4 и р65-субъединица транскрипционного фактора NF-κB входят в состав одного

комплекса с мол. массой примерно 600 кДа, не связанного с цитоскелетными структурами. В составе этого комплекса с помощью специфических антител были обнаружены тубулин и тропомиозин. Для дальнейшей идентификации белков, входящих в состав этого комплекса, цитоплазматический экстракт клеток A431 был разделен методом гель-фильтрации на колонке Superose 6 и из фракций, соответствующих мол. массам 550—900 кДа, были преципитированы комплексы с поликлональными антителами против р65-субъединицы и альфа-актина-4. При электрофоретическом разделении полученных комплексов были обнаружены интенсивные полосы в области 90 и 70 кДа, в которых методом масс-спектрометрии были обнаружены белки теплового шока 70 и 90. По-видимому, эти белки теплового шока принимают участие в формировании этих мультимолекулярных комплексов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-01190-а).

**МЕХАНИЗМЫ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ ПРИ ИНФЕКЦИИ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ПАТОГЕНАМИ.** © Е. С. Божокина. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

В ходе эволюции различные патогены разработали стратегии для выключения, разрушения, имитирования и использования путей передачи сигналов клетки хозяина, чтобы эксплуатировать ее максимально эффективно для себя. Прежде всего, они разрушают передачу сигнала в клетке хозяина путем введения собственных эффекторов, имитирующих функции нативных клеточных белков: убиквитин-лигазы, регуляторов Rho-GTPаз, компонентов клеточного цитоскелета и др. Бактерии *Salmonella enterica*, вызывающие гастроэнтерит у человека, доставляют свои эффекторы напрямую в клетку с помощью специальной системы доставки T3SS, а их эффекторный белок SopA является убиквитин-лигазой типа NECT-E3. Грамотрицательный патоген, вызывающий тяжелую пневмонию, *L. pneumophila*, кодирует убиквитин-лигазу LubX, которая влияет на снижение иммунного ответа организма. Показано, что некоторые эффекторы патогена *Pseudomonas syringae* также имеют домен убиквитин-лигазы. Многие бактериальные патогены несут факторы вирулентности, влияющие на активность Rho-GTPаз, и таким образом модулируют цитоскелет клеток хозяина. В частности, эффектор бактерий *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* YopE является GAP-эффектором для Rac1, RhoA и Cdc42 Rho-GTPаз клетки. Распространенный внутрибольничный патоген *Pseudomonas aeruginosa* благодаря эффекторам ExoS и ExoT, имитирующим GAP-белки хозяина, препятствует поглощению бактерий макрофагами. *S. typhimurium*, влияя на актин цитоскелета хозяина посредством эффекторов, имитирующих как GAP-, так и GEF-белки, напротив, обеспечивает фагоцитоз бактерий в норме нефагоцитирующими клетками. Некоторые патогены выделяют белки, напрямую имитирующие G-белки семейства Ras. Фосфоинозитиды (PI) вовлечены во многие клеточные процессы, такие как модулирование и функционирование актинового цитоскелета, контроль везикулярного транспорта и развития внутриклеточных компартментов, рецепторопосредованной передачи сигнала, а также выполняют важную роль при фагоцитозе. Поэтому

внутриклеточные бактерии (*Salmonella*, *Listeria* и *Shigella*) разработали механизмы использования клеточного метаболизма по этому пути в своих целях с помощью собственных эффекторов. А такие внеклеточные бактерии, как энтеропатогенные *E. coli* (EPEC), напротив, предотвращают фагоцитоз посредством ингибирования PI(3)-киназы. Также секретируемые бактериальные эффекторы могут напрямую атаковать иммунную систему хозяина, заглушая внутренние пути передачи сигнала иммунного ответа: MAP-киназный и NF-κB-зависимый пути. Таким образом, разные механизмы использования бактериями систем клетки-хозяина приводят к эффективной колонизации, репликации, выживанию и распространению патогенов. Эти механизмы очень эффективны и очень специфичны, тем самым каждый патоген адаптируется к собственной нише в соответствующем хозяине.

**АЛЬФА-AKТИНИН-4 ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С N-КОНЦЕВОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ RELA/P65 IN VITRO И МОЖЕТ ПРИНИМАТЬ УЧАСТИЕ В ФОРМИРОВАНИИ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ДНК-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ.** © А. В. Большакова, В. Н. Бабаков, Г. П. Пинаев, О. А. Петухова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Механизмы, с помощью которых актиновый цитоскелет принимает участие в сигнальных каскадах и регуляции экспрессии генов, остаются невыясненными. Участие актинового цитоскелета в этих процессах может быть связано с активностью актинсвязывающих белков. Одним из таких актинсвязывающих белков является α-актинин. α-актинин обнаруживается как в цитоплазме, так и в ядре, где он способен взаимодействовать с транскрипционными факторами. Ранее полученные данные о солокализации α-актина и RelA/p65-субъединицы транскрипционного фактора NF-κB в клетках A431 и обнаружении α-актина-4 в иммунопреципитатах, осаждающихся антителами к RelA/p65-субъединице NF-κB, послужили основанием для проверки возможности прямого взаимодействия α-актина с р65-субъединицей NF-κB и участия его в регуляции NF-κB. С использованием метода GST-pull down было показано, что только N-концевая последовательность RelA/p65 взаимодействует с α-актином напрямую. Методом ретардации в клетках A431 выявлялось несколько κB-специфических ДНК-белковых комплексов, один из которых идентифицировался как содержащий р65/p50. Конкурентный анализ показал, что α-актинин-4 может присутствовать в составе κB-специфического комплекса с низкой электрофоретической подвижностью. Кроме того, сочетанием методов ретардации и вестерн-блот-анализа α-актинин-4 обнаруживался в ДНК-белковом комплексе, содержащем р65/p50. Однако при использовании данного метода присутствие α-актина-4 и RelA/p65 в комплексах с низкой электрофоретической подвижностью не подтвердилось. Использование в реакции связывания очищенных белков позволило обнаружить, что α-актинин-4 может участвовать в образовании ДНК-белковых комплексов, причем взаимодействие RelA/p65 с α-актином-4 не препятствует образованию κB-специфического ДНК-белкового комплекса, а только изменяет его подвижность.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект



07-04-011-90-a), Ведущих научных школ (7852.2006.4) и гранта Visby of Swedish Institute (№1361/2006).

**АППАРАТ РАННЕГО ВЕЗИКУЛЯРНОГО ТРАНСПОРТА МОЖЕТ СЛУЖИТЬ ОРГАНИЗАТОРОМ СЕТИ МИКРОТРУБОЧЕК.** © И. Б. Бродский,<sup>1</sup> Е. С. Надеждина.<sup>2</sup> <sup>1</sup>Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, brodsky-i@yandex.ru и <sup>2</sup>Институт белка РАН, Пушкино.

Микротрубочковый цитоскелет в эукариотических клетках позволяет осуществлять направленный транспорт различных грузов с помощью белков-моторов на расстояния, сравнимые с размерами самой клетки. В большинстве культур фибробластов мы можем наблюдать радиальную структуру сети микротрубочек, при которой минус-концы микротрубочек собраны в центре организации, где часто находится centrosoma, а плюс-концы расположены на периферии клетки. Механизмы образования радиальной системы микротрубочек остаются непонятными. Обычно основную роль здесь отводят centrosome, которая нуклеирует микротрубочки и заякоривает их в центре организации, однако радиальная система микротрубочек может образовываться и без участия centrosome. В данной работе, чтобы исследовать роль мембранных органелл в организации клеточных микротрубочек, были получены бесцентросомные цитопласты из клеток HeLa и BSC-1, которые и при отсутствии centrosome образуют радиальную систему микротрубочек. Изначально нами предполагалось, что формирование бесцентросомной радиальной сети микротрубочек идет за счет компактной структуры аппарата Гольджи (АГ), собирающегося в центре цитопласты после отмывки нокадазола — агента, разрушающего микротрубочки и необходимого для получения цитопласты. Однако ингибирование процесса сборки компактного АГ воздействием брэфелдина А (BFA) не препятствовало возникновению радиальной системы микротрубочек, поэтому АГ не может считаться движущей силой данного процесса. Окадаевая же кислота (ОА), которая является ингибитором протеинфосфатаз и экспорта белка из эндоплазматического ретикулума (ЭР) в СОП-везикулы, эффективно блокировала формирование радиальной сети микротрубочек в цитопластах. Следовательно, данный сегмент аппарата транспорта может принимать участие в организации системы микротрубочек. Возможно, однако, что влияние ОА на организацию системы микротрубочек основано на подавлении фосфатаз. Поскольку при комбинации ингибиторов СОП (BFA) и СОП (ОА) бесцентросомные цитопласты образуют радиальную сеть микротрубочек, можно предположить, что основная роль в формировании радиальной сети микротрубочек в бесцентросомных цитопластах принадлежит промежуточному компартменту (ERGIC). Это следует из того, что ОА, блокируя формирование СОП-везикул, вызывает потерю АГ и ERGIC по СОП-зависимому механизму. Однако в присутствии брэфелдина А ERGIC сохраняется, что и может объяснять образование радиальной системы микротрубочек в этих условиях. Для более специфической проверки гипотезы участия аппарата раннего везикулярного транспорта в организации клеточных микротрубочек были получены бесцентросомные цитопласты из клеток, экспрессирующих доминантно-негативный мутант ГТФазы Sar1a — Sar1a[T39N], который

ингибирует экспорт белков из ЭР с помощью СОП-зависимого транспорта. Действительно, такие цитопласты не могли эффективно образовывать радиальную систему микротрубочек без участия centrosome в отличие от цитопласты с ГТФазой Sar1 дикого типа. Результаты данных экспериментов позволяют предположить, что в организации радиальной системы микротрубочек в бесцентросомных цитопластах ведущую роль играет аппарат раннего везикулярного транспорта, который, возможно, путем динеин-динактинзависимого заякоривания микротрубочек и способствует их организации в радиальную сеть.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-01697-а), а также программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

**НОВЫЕ ИЗОФОРМЫ БЕЛКА P150GLUED, ОСНОВНОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ДИНАКТИНА.** © С. А. Брянцева,<sup>1</sup> А. В. Бураков,<sup>1</sup> О. Н. Жаппарова,<sup>1</sup> Е. С. Надеждина.<sup>2</sup> <sup>1</sup>НИИ ФХБ им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова и <sup>2</sup>Институт белка РАН, Москва, sofia.bryantseva@gmail.com.

Динактин, кофактор внутриклеточного мотора динеина, представляет собой сложный мультисубъединичный белковый комплекс, основной единицей которого является белок p150Glued. Для данного белка было показано существование двух изоформ — изоформы-1 размером 150 кДа и изоформы-2 размером 135 кДа (p135). Однако анализ нуклеотидных баз данных показал, что изоформа-1 состоит из двух дополнительных изоформ: длинной p150-1A и короткой p150-1B, имеющей 20-аминокислотную делецию в районе микротрубочко-связывающего участка, располагающегося на N-конце. Мы показали, что две изоформы динактина различаются по своему взаимодействию с микротрубочками. При экспрессии в клетках длинная изоформа p150-1A располагается по всей длине микротрубочек, в то время как короткая p150-1B — в виде «комет» на плюс-концах микротрубочек и никогда — по всей длине микротрубочек. N-концевые фрагменты изоформ p150-1A и p150-1B, синтезированных в *E. coli*, инкубировали с микротрубочками, собранными *in vitro*, и осаждали через глицериновую подушку, а затем анализировали осадки и супернатанты. Большая часть изоформы p150-1A связывалась с микротрубочками, в то время как изоформа p150-1B присутствовала в осадке микротрубочек лишь в незначительном количестве. Мы также показали, что изоформы динактина экспрессируются тканеспецифично: длинная изоформа p150-1A обильно присутствует в тканях нервного происхождения и отсутствует в ненервных тканях взрослых животных и человека, в то время как короткая изоформа p150-1B представлена повсеместно. Изоформа p150-1B преобладает в различных линиях культивируемых клеток, таких как Vero и HeLa, однако в культивируемых клетках в минорном количестве присутствует и длинная изоформа p150-1A. Экспрессия изоформы p150-1A начинается при переносе нервных клеток из тканей в культуру. В условиях экспериментальной раны монослоя клеток уровень экспрессии p150-1A также увеличивается. Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток Vero поликлональными антителами к варибельному участку p150Glued выявило локализа-

цию длинной изоформы на centrosоме и по всей длине определенного пула микротрубочек. Данный пул микротрубочек не совпадал с пулами, обогащенными тирозин-тубулином или ацетилированным тубулином. В условиях экспериментальной раны монослоя изоформа p150-1A была представлена на микротрубочках, направленных к ведущему краю клеток, обращенному в рану. Распределение p150-1A в клетках в этом случае было асимметричным в отличие от симметричного (в плане концентрации) распределения тубулина микротрубочек. Таким образом, изоформы имеют различное распределение в клетках: короткая изоформа p150-1B располагается в виде «комет» на плюс-концах микротрубочек, а длинная p150-1A — по всей длине микротрубочек. Можно предположить, что две изоформы динактина имеют различные функции — изоформа p150-1B участвует в установлении взаимодействия между транспортируемым грузом и микротрубочкой по принципу поиска—захвата, в то время как изоформа p150-1A регулирует перемещение динеина вдоль всей микротрубочки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-01697-а), а также программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

**ПРОТЕИНКИНАЗА LOSK(SLK) РЕГУЛИРУЕТ МЕЖКЛЕТОЧНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ И НАПРАВЛЕННОЕ ПЕРЕМЕЩЕНИЕ КЛЕТОК ПО СУБСТРАТУ.** © А. В. Бураков,<sup>1</sup> Е. С. Надеждина.<sup>1,2</sup> <sup>1</sup>НИИ ФХБ им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова и <sup>2</sup>Институт белка РАН, Москва.

Способность клеток млекопитающих к перемещению по субстрату является важным их свойством, играющим определяющую роль в эмбриогенезе, при заживлении ран или при метастазировании на завершающих стадиях канцерогенеза. К настоящему времени достаточно хорошо описаны механические принципы такого движения и основные клеточные структуры и белки, отвечающие за это. Движение клеток осуществляется благодаря элементам цитоскелета. В частности, выдвижение ламеллы происходит благодаря полимеризации ветвящихся актиновых филаментов на переднем крае движущейся клетки; известно также, что в поляризованной движущейся клетке микротрубочки стабилизированы по направлению движения, и показана необходимость малых ГТФаз для поляризации и последующего движения. Движение клетки может быть инициировано как некими химическими аттрактантами, так и в случае клеток соединительной ткани просто возникновением пустого места по соседству, образующегося в случае механического повреждения ткани или в результате апоптотических процессов. До сих пор не удается проследить полностью всю цепочку событий внутри клетки, происходящих с момента поступления сигнала к движению до успешного прибытия клетки на место назначения. В настоящее время в России и за рубежом ведется ряд исследований клеточной подвижности, при этом одной из экспериментальных моделей для изучения движения клеток является искусственно нанесенная рана монослоя. В данной работе мы изучали влияние на клеточную подвижность протеинкиназы LOSK. Входящая в состав семейства Ste20-подобных киназ протеинкиназа LOSK была впервые описана в нашей лаборатории

как белок, ассоциированный с centrosомой и микротрубочками (Zinovkina et al., 1997, FEBS Lett., 414 (1) : 135—139). Позднее нами было продемонстрировано, что киназная активность LOSK необходима для организации сети микротрубочек в интерфазной клетке в виде звезды с центром организации на centrosоме (Бураков и др., 2005, ДАН, 403 (6) : 840—842; Burakov et al., 2008, Mol. Biol. Cell, 19 (5) : 1952—1961). Клетки с подавленной активностью LOSK не входят в митоз, однако способны длительное время существовать на стадии интерфазы. В данной работе мы продемонстрировали, что подавление активности LOSK меняет адгезивные свойства и поведение клеток при их вползании в рану монослоя. У таких клеток, по-видимому, нарушены межклеточные взаимодействия с соседними клетками, и при выдвижении в рану они не в состоянии постоянно выдерживать направление движения. В результате спустя несколько часов после начала движения клетки с подавленной активностью LOSK отстают от своих прежних соседей, несмотря на то что актиновый цитоскелет остается динамичным и обеспечивает в прежней мере выдвижение ведущего края клетки. Таким образом, нами найден новый регулятор клеточной подвижности. В дальнейшем планируется описать субстрат данной киназы, чтобы выявить следующих участников сигнального каскада, ответственного за направленное движение клетки в рану монослоя.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-01697-а), а также программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

**ОРГАНИЗАЦИЯ ЦИТОСКЕЛЕТА ФИБРОБЛАСТОВ 3Т3 И 3Т3-SV40 В ПРИСУТСТВИИ АНТИОКСИДАНТОВ.** © Е. А. Вахромова, К. М. Курпичникова, И. А. Гамалей. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, igamaley@mail.cytspb.rssi.ru.

Выясняли и сравнивали влияние двух антиоксидантов — N-ацетилцистеина (NAC) и  $\alpha$ -липоевой кислоты (ALA) — на структуру микрофиламентов и микротрубочек мышечных фибробластов 3Т3 и их трансформантов 3Т3-SV40. Обнаружили, что ALA в концентрации 1.25 mM, равно как и 10 mM NAC, вызывает разборку актиновых филаментов в клетках обоих типов. При этом дезорганизация актинового цитоскелета тем более выражена, чем больше концентрация антиоксиданта. Эта разборка обратима: удаление антиоксиданта (ALA) из среды культивирования клеток приводит к постепенному восстановлению первоначальной структуры и организации микрофиламентов в клетках обоих типов. При этом мы обнаружили, что NAC обладает уникальной особенностью: удаление этого антиоксиданта после его длительного действия приводит к тому, что клетки 3Т3-SV40 временно приобретают организацию микрофиламентов, свойственную клеткам 3Т3, а именно утолщенные и хорошо выраженные стресс-фибриллы, не обнаруживаемые в контрольных клетках 3Т3-SV40. Такой временной нормализации трансформированного фенотипа при действии и после удаления ALA мы не наблюдали. Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток 3Т3 и 3Т3-SV40 на тубулин не выявило никаких видимых изменений организации системы микротрубочек в этих клетках как в присутствии антиоксидантов (NAC или ALA), так и после их удаления.

из среды культивирования клеток. Однако необходимо отметить, что даже в контрольных необработанных клетках одного типа возможны различные варианты пространственной организации и структуры тубулиновой сети (радиальное или хаотичное расположение микротрубочек, дискретное их окрашивание), что в значительной степени затрудняет качественную оценку изменений ее структурной организации. Тем не менее в некоторых случаях как в присутствии, так и после удаления антиоксиданта мы отмечаем незначительное усиление интенсивности свечения антител против альфа-тубулина по сравнению с контрольными клетками 3T3 (или 3T3-SV40), что могло бы говорить о количественных изменениях тубулина в микротрубочках. Однако такой вывод требует иных методических подходов. Таким образом, можно заключить, что антиоксиданты NAC и ALA вызывают четко выраженные и хорошо детектируемые изменения лишь в структуре актинового цитоскелета и не нарушают видимой целостности микротубулярной сети. Впоследствии мы обнаружили, что реорганизация микрофиламентов при действии NAC или ALA на трансформированные клетки 3T3-SV40 является необходимым условием для их будущих функциональных изменений (чувствительности к бактериальной инвазии и литической активности естественных киллерных клеток).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00467).

**ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ Met-РЕЦЕПТОРА В РЕГУЛЯЦИИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ И ТРАНСКРИПЦИОННОЙ ФУНКЦИИ БЕТА-КАТЕНИНА В КЛЕТКАХ С РАЗЛИЧНЫМ СТАТУСОМ МЕЖКЛЕТОЧНОЙ АДГЕЗИИ.** © И. В. Гончар, Е. В. Петрова, Г. Ф. Решетникова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Повышение активности Met-рецептора гепатоцитарного фактора роста (ГФР) необходимо для стимуляции клеточной подвижности и часто сопровождает процесс инвазии раковых клеток эпителиального происхождения. Клетки злокачественных опухолей эпителия характеризуются также ослаблением межклеточных адгезионных контактов, осуществляемых E-кадхерином. Важнейшим сигнальным компонентом E-кадхеринового комплекса, регулирующим транскрипцию ряда важных генов в зависимости от адгезионного статуса клеток, является бета-катенин. На различных эпителиальных клеточных линиях, как образующих полноценные E-кадхериновые адгезионные контакты (HT-29 и BT-474), так и лишенных E-кадхерина (SW-480, BT-549), нами исследовалась сигнальная функция бета-катенина в зависимости от активности Met-рецептора. Методами иммунофлуоресценции и субклеточного фракционирования было показано, что в клетках, лишенных E-кадхерина, значительно увеличивается доля бета-катенина, содержащегося в цитоплазме и ядре. При этом уменьшение экспрессии E-кадхерина сопровождается ростом доли свободного бета-катенина, что приводит к значительному повышению транскрипционной активности в клетках SW-480 и BT-549 по сравнению с клетками HT-29 и BT-474. Активация Met-рецептора в линии клеток HT-29 приводит к появлению ядерного и цитоплазматического пулов бета-катенина, а также повышению

его транскрипционной активности. Эти события сопровождаются разрушением плотных адгезионных контактов и клеточной миграцией (расползанием). Стимуляция Met-рецептора клеток HT-29, экспрессирующих значительное количество E-кадхерина, приводит к появлению фосфорилированного по тирозину бета-катенина. В то же время в лишенных E-кадхерина клетках SW-480 конститутивно присутствует определенный пул фосфорилированного по тирозину бета-катенина, который практически не возрастает при добавлении ГФР. Однако в клетках HT-29, находящихся в плотном монослое, активация Met-рецептора не приводит к тирозиновому фосфорилированию бета-катенина и релокализации его с мембраны в цитоплазму и в ядро. Это свидетельствует о том, что наличие нормального E-кадхеринового комплекса способствует сохранению функции контактного торможения у опухолевых клеток. Разрушение этого комплекса является необходимым этапом в развитии инвазивного фенотипа. Этот процесс может идти как по пути нарушения функции одного из компонентов E-кадхеринового комплекса, так и за счет конститутивной активации Met-рецептора. Ключевым компонентом взаимодействия данных сигнальных систем является бета-катенин.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-49333а) и программ президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

**ИЗМЕНЕНИЯ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ КОНТАКТОВ ПРИ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК.** © И. Ю. Житняк, Н. А. Глушанкова. НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва, irishaz@mail.ru.

Морфологическая трансформация является важнейшей характеристикой злокачественных эпителиальных опухолей, определяя способность клеток к инвазии. В нашей работе были исследованы клетки эпителиальной линии IAR, трансформированные онкогеном N-Ras и диметилнитрозамином. По результатам флуоресцентно-микроскопического исследования белков межклеточных контактов и актиновых структур полученные линии были разделены на группы. Первая группа (ранние этапы трансформации) включает в себя линии клеток, утративших кольцевой актиновый пучок, характерный для эпителия, экспрессирующих эпителиальный E-кадхерин, а также мезенхимальный N-кадхерин. Такие клетки имеют полигональную форму, их площадь значительно уменьшена по сравнению с нетрансформированными эпителиоцитами. Ко второй группе были отнесены линии клеток с более значительными морфологическими изменениями (поздние этапы трансформации); в таких клетках отсутствует экспрессия E-кадхерина, межклеточные контакты содержат мезенхимальный N-кадхерин, кольцевой актиновый пучок также отсутствует. Клетки имеют веретеновидную форму, площадь их значительно уменьшена по сравнению с контролем. Клетки обеих групп дают опухоли в бестимусных мышах. В результате трансформации наблюдаются изменения формы межклеточных адгезионных контактов. На ранних этапах трансформации непрерывные тангенциальные контакты, характерные для нормальных эпителиоцитов, становятся прерывистыми, точечными, короткими радиальными. На поздних этапах



наблюдаются радиальные контакты. При морфологической трансформации наблюдаются также изменения плотных контактов: на ранних этапах происходят изменения формы — контакты становятся прерывистыми, на поздних этапах не формируются совсем, что приводит к нарушению барьерной функции эпителия. Видеомикроскопические наблюдения показали, что клетки на поздних этапах трансформации способны к индивидуальной миграции в отличие от клеток на ранних этапах, двигающихся в ране единым пластом, не разрывая межклеточных контактов. Экзогенная экспрессия Е-кадгерина в клетках на поздних этапах трансформации приводит к частичной реверсии эпителиального фенотипа, миграция таких клеток становится коллективной. Таким образом, нами впервые были обнаружены ранние этапы морфологической трансформации, во время которой клетки уже претерпевают значительные изменения актинового цитоскелета и межклеточных адгезионных и плотных контактов, сохраняя способность к коллективной миграции, а также способны давать опухоли при прививке бестимусным мышам.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-49214а).

**ИЗМЕНЕНИЕ СВОЙСТВ МИКРОТРУБОЧЕК В ХОДЕ ЭНДОЦИТОЗА ЛИГАНД-РЕЦЕПТОРНЫХ КОМПЛЕКСОВ В ИНТЕРФАЗНЫХ КЛЕТКАХ HeLa.** © М. В. Злобина, М. В. Харченко, Д. С. Латкин, Е. С. Корнилова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Микротрубочки долгое время считали пассивными рельсами, по которым перемещаются везикулы в процессе везикулярного транспорта. Однако недавно нами было установлено, что они могут претерпевать изменения на определенных стадиях эндоцитоза рецептора ЭФР в интерфазе. Так, на стадии ранних эндосом микротрубочки сохраняют радиальность, затем на стадии созревания эндосом и взаимодействия поздних эндосом с лизосомами микротрубочки фрагментируются и деполимеризуются, а уже на стадии формирования вторичных лизосом и их дальнейшего экзоцитоза радиальная структура тубулинового цитоскелета восстанавливается. Выяснилось, что на разных стадиях эндоцитоза микротрубочки обладают разной устойчивостью к раствору для экстракции растворимых цитоплазматических белков на основе буфера PIPES, pH 6.8 (цитоскелетному буферу, или ЦБ). Так, «ранняя» радиальная сеть полностью деполимеризовалась, тогда как на более поздней стадии дезорганизации/фрагментации «губкоподобная» структура в значительной мере сохранялась, что свидетельствует об изменении свойств МТ в разных фазах эндоцитоза. Одним из механизмов, с помощью которых микротрубочки могут менять свои свойства, являются многочисленные посттрансляционные модификации тубулина, в частности ацетилирование. При анализе динамики ацетилирования микротрубочек в процессе эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов оказалось, что в интактных клетках микротрубочки ацетилированы преимущественно в области ЦОМТ. При помещении клеток в холодовую баню (4 °С) микротрубочки деполимеризуются и тубулин деацетилюруется. Через 5—15 мин после перевода клеток на 37 °С микротрубочки реполимеризуются и вновь ацетилюются в области

ЦОМТ. При этом площадь ацетилированных микротрубочек в клетках с индуцированным эндоцитозом ЭФР-рецепторных комплексов меньше, чем в контрольных клетках при восстановлении структуры микротрубочек после холода. Через 30 мин уровень ацетилирования в контрольных клетках и клетках с индуцированным эндоцитозом был одинаковым. Максимальный уровень ацетилирования микротрубочек наблюдался через 60 мин после запуска эндоцитоза и значительно превышал уровень ацетилирования в контрольных клетках. Затем в клетках с индуцированным эндоцитозом происходило постепенное снижение уровня ацетилирования микротрубочек, и через 2 ч после запуска эндоцитоза ацетилированные микротрубочки практически не выявлялись. Следует отметить, что в контрольных клетках уровень ацетилирования практически не изменялся на протяжении всего эксперимента. Известно, что кинезин-1 — моторный белок, участвующий в доставке грузов в направлении к плазматической мембране клетки, — предпочтительнее связывается с ацетилированными тубулином. Возможно, повышение уровня ацетилирования микротрубочек на этапе после формирования вторичных лизосом необходимо для их экзоцитоза.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-01215-а) и ГК ФЦП №02.512.12.0024 «Молекулярная и клеточная биология».

**«ДИНАМИЧЕСКАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ» ЭНДОЦИТОЗА.** © Е. С. Корнилова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, elena.kornilova@gmail.com.

Широко распространенное представление о везикулярном транспорте сводится к тому, что как конститутивные, так и стимулируемые транспортные потоки протекают с определенными скоростями, а наблюдаемые различия определяются типом клеток. «Жертвой» такого представления стал и эндоцитоз, в том числе рецепторопосредованный, для которого на основе уравнений баланса масс пытались вычислять константы скоростей таких этапов, как интернализация, рециклирование и деградация лиганд-рецепторных комплексов. Однако наш многолетний опыт изучения регуляции эндоцитоза рецепторов эпидермального фактора роста (ЭФР) на клеточных линиях различного происхождения показывает, что все эти процессы не являются стационарными, раз и навсегда определенными для каждой конкретной линии. Более того, клетки одной и той же линии могут менять свое поведение в весьма широком диапазоне в течение относительно короткого времени. Оказалось, что такие изменения не связаны со старением линии, а в значительной степени определяются сывороткой, используемой при культивировании. Этот факт позволяет предполагать, что сочетание компонентов сыворотки, многие из которых обладают сигнальной потенцией, в значительной степени определяет динамику эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов. Действительно, появляется все больше данных о том, что белки-регуляторы транспортных процессов являются мишенями сигнальных молекул, а иногда и компонентами сигнальных каскадов. Это, в частности, отражается и на динамике и характере описанного нами ранее ремоделирования системы микротрубочек в ходе эндоцитоза рецептора ЭФР. В докладе на основе литературных и собственных данных будут представлены возможные

«точки пересечения» сигнальных и транспортных путей на примере эндоцитозного пути рецептора ЭФР и обсуждены возможные последствия таких взаимосвязей.

**ПОДБОР УСЛОВИЙ ЭКСТРАКЦИИ ДЕПОЛИМЕРИЗОВАННОГО ТУБУЛИНА, ПОЗВОЛЯЮЩИХ СОХРАНИТЬ НАТИВНУЮ СТРУКТУРУ ИНТЕРФАЗНЫХ МИКРОТРУБОЧЕК.** © Д. С. Латкин,<sup>1,2</sup> М. В. Злобина,<sup>1</sup> М. В. Харченко,<sup>1</sup> Е. С. Корнилова.<sup>1</sup> <sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и <sup>2</sup> С.-Петербургский государственный университет.

Стимуляция эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов приводит к последовательной реорганизации системы микротрубочек (МТ) в культивируемых интерфазных клетках. После инкубации клеток при 4 °С происходит разборка МТ. Через 15 мин после стимуляции эндоцитоза восстанавливается радиальная сеть МТ. Затем параллельно с увеличением размера эндосом и перемещением их к центру клетки (30 и 60 мин) число длинных радиальных МТ уменьшается, а интенсивность окрашивания тубулина вокруг ЦОМТ усиливается. В целом система приобретает «губкоподобный» вид (спутанная сеть МТ). Отдельные МТ укорачиваются, фрагментируются и даже частично деполимеризуются. В дальнейшем радиальная система МТ восстанавливается. Для оценки доли полимеризованного тубулина на каждой стадии реорганизации системы МТ мы использовали буфер для экстракции растворимых цитоплазматических белков, далее называемый цитоскелетным буфером (ЦБ). Такие буферы разного состава довольно широко применяются в исследованиях актинового цитоскелета, для изучения же тубулинового цитоскелета их используют гораздо реже. Первоначально мы использовали ЦБ следующего состава: 20 мМ HEPES (pH 7.4), 3 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ NaCl, 0.1%-ный Triton X-100, 1 мМ Na<sub>2</sub>V<sub>0</sub>4, 1 мМ NaF, 10%-ный глицерин и коктейль протеазных ингибиторов (Invitrogen). Мы ожидали, что такая обработка удалит из клетки деполимеризованный тубулин, тогда как интактные МТ останутся. Однако оказалось, что в ходе эндоцитоза чувствительность МТ к экстракции изменяется, что приводит к нарушению морфологии МТ цитоскелета при обработке ЦБ при комнатной температуре по сравнению с необработанными клетками. МТ в контрольных клетках и восстановленные на ранней стадии эндоцитоза радиальные МТ практически полностью удалялись из клеток, оставались лишь единичные искривленные МТ разной длины. Когда же в не обработанных буфером клетках МТ приобретали наиболее спутанный, фрагментированный вид («губкоподобная» организация тубулинового цитоскелета), обработка клеток ЦБ практически не изменяла морфологию МТ. Этот «полезный артефакт» свидетельствует о том, что радиальные ранние и более поздние «фрагментированные» МТ значительно различаются по своим свойствам. Однако для оценки степени деполимеризации МТ на каждой стадии нам необходим буфер, позволяющий сохранять даже измененные, но полимеризованные тубулиновые структуры («нативную морфологию») и избавляться от деполимеризованного тубулина. С этой целью мы сравнили действие ЦБ, приготовленных на основе 10 мМ PIPES (pH 6.8) как с добавлением глицерина (10 %) или 300 мМ сахарозы (Helicon), состав которых взят из литературы, так и ЦБ с добавлением ПЭГ 2000, 4000 и 9000 (Loba chemie) в концентрациях 4 и 12 % при комнатной температуре и 37 °С.

Нами были получены следующие результаты: обработка клеток ЦБ с добавлением глицерина и сахарозы ведет к разрушению радиальной сети МТ, общее количество МТ уменьшается, они искривляются и частично фрагментируются. Применение же ЦБ с ПЭГ дает наилучшие результаты при использовании 12%-ного ПЭГ 9000 при 37 °С, что сводит к минимуму повреждения МТ в контрольных клетках и на всех исследованных стадиях эндоцитоза. Морфология полученного в ходе экстракции тубулинового цитоскелета не отличается от таковой в не обработанных ЦБ клетках на разных стадиях эндоцитоза. Протестированные буферы при этом по-разному влияют на структуру актинового цитоскелета. Однако полученные результаты позволяют заключить, что обработка ЦБ с добавлением 12%-ного ПЭГ 9000 при 37 °С не влияет на полимеризованный тубулин, но вымывает димеры, в общем не изменяя нативную морфологию системы МТ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 6-04-49046-а и 09-04-01215-а) и ГК ФЦП №02.512.12.0024 «Молекулярная и клеточная биология».

**ИЗМЕНЕНИЕ МОРФОЛОГИИ И ХАРАКТЕРА МИГРАЦИИ ФИБРОБЛАСТОВ В РЕЗУЛЬТАТЕ ТРАНСФОРМАЦИИ ВИРУСОМ SV-40.** © М. Е. Ломакина, А. Ю. Александрова. НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва, lomakinam@email.com.

Форма клетки во многом определяет ее способность к миграции. При трансформации наблюдается существенное изменение как морфологических свойств, так и локомоторного поведения клеток. Изучение механизмов подвижности клетки и ее нарушений в результате трансформации, приводящих к появлению у клеток способности к инвазии, является одной из важнейших задач современной клеточной биологии. В своей работе мы исследовали изменения в распределении, морфологии и динамике активного края и связанные с этим изменения в характере клеточного движения в результате трансформации. В качестве контроля нами использовались эмбриональные легочные фибробласты человека MRC-5, а моделью трансформации служили их производные MRC-5V1 и MRC-5V2, полученные путем инфицирования исходной линии вирусом SV-40 (Simian Virus 40). Мы обнаружили, что при трансформации существенным образом меняется распределение активного края по периметру клетки. Так, у нетрансформированных фибробластов линии MRC-5 активный край сосредоточен, как правило, в 1—3 крупных ламеллах на передней стороне клетки, которые составляют около 55 % клеточного края, а также имеются хорошо выраженные стабильные боковые участки края. У трансформированных клеток (MRC-5V1 и MRC-5V2) относительная длина активного края возрастает до 86—87 %, появляются участки псевдоподиальной активности по всему периметру клетки и практически нет стабильных участков. Кроме того, даже на внешне стабильном крае (13—14 % клеточного края) трансформированных клеток постоянно образуются мелкие псевдоподии, в которых при иммунофлуоресцентном окрашивании выявляется Agr2/3-комплекс, что свидетельствует о полимеризации актина и формировании протрузий на этих участках края и не позволяет считать их «истинно стабильными». При трансформации клеток вирусом SV-40 также



изменяются морфология и динамика самих участков псевдоподиальной активности. Посредством компьютерной обработки результатов прижизненного видеонаблюдения клеток было выявлено, что у трансформированных клеток протрузии на переднем крае клетки становятся более мелкими, а их частота значительно увеличивается (в 2.5—3.5 раза). При помощи конфокальной микроскопии было показано, что у трансформированных клеток видны значительные утолщения ламеллы (до 4.5 мкм, по сравнению с 2 мкм у контрольных клеток MRC-5) — раффлы, возникающие как на активном крае, так и по всей верхней поверхности клетки. Наряду с изменениями в распределении, морфологии и динамике активного края в результате трансформации существенным образом меняется локомоторное поведение клеток. Изучив передвижения нормальных и трансформированных клеток в редкой культуре, мы показали, что трансформированные клетки движутся гораздо более хаотично. Помимо этого, трансформированные клетки в отличие от нормальных способны к миграции сквозь трехмерные матричные структуры (матригель), что доказывает их способность к инвазии. Таким образом, можно предположить, что благодаря перераспределению и изменению характера псевдоподиальной активности клетки приобретают способность легко изменять направление движения, и, возможно, именно эта особенность обеспечивает им проникновение сквозь окружающие ткани и матричные структуры, определяя тем самым инвазивное поведение опухолевых клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00452а) и гранта НШ-4064.2008.4.

**ГИПОТЕЗА: ВИМЕНТИНОВЫЕ ПФ ЗАЩИЩАЮТ КЛЕТКИ ОТ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА.** © *Е. А. Матвеева, А. А. Минин*. Институт белка РАН, Москва.

Роль виментиновых промежуточных филаментов (ПФ) является предметом активных дискуссий в течение последних 15 лет с момента получения нокаутной мыши, лишенной гена виментина и имеющей при этом нормальный фенотип (Colucci-Guyon et al., 1994, Cell, 79 : 679—694). Позднее было показано, что как целые животные, подвергнутые различным видам стресса, так и безвиментиновые линии клеток, полученных из них, лишены способности адаптироваться. Каким образом виментин помогает клеткам преодолеть условия стресса, в том числе и окислительного, остается пока неясным. По нашим данным, виментиновые ПФ могут связывать митохондрии, непосредственно взаимодействуя N-концевым доменом виментина с поверхностью этих органелл. Часть молекулы виментина, расположенная между 44-м и 69-м аминокислотными остатками, содержит участок, ответственный за это взаимодействие и напоминающий сигнальные последовательности других белков, локализованных в наружной мембране митохондрий. Как целый виментин в составе ПФ, так и фрагмент его молекулы, содержащий этот участок, при экспрессии в клетках, лишенных виментина, увеличивают трансмембранный потенциал митохондрий. Кроме того, клетки, содержащие виментин, обладают большей устойчивостью к действию перекиси водорода, чем клетки, лишенные виментина. Наши результаты вместе с ранее опубликованными литературными данными

ми позволяют предположить, что виментин является еще одним антиапоптотическим фактором в клетках.

**РОЛЬ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ФИЛАМЕНТОВ В ЛОКАЛИЗАЦИИ МИТОХОНДРИЙ.** © *А. А. Минин,<sup>1</sup> И. С. Черноиваненко,<sup>2</sup> Е. А. Матвеева.<sup>1</sup>* <sup>1</sup>Институт белка РАН и <sup>2</sup>Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва.

Функции митохондрий зависят от их внутриклеточного распределения, и они, как правило, локализованы в местах наибольшего потребления энергии. Настоящая работа посвящена выяснению роли в процессе распределения митохондрий одного из компонентов цитоскелета — промежуточных филаментов (ПФ). Для этого использовали две экспериментальные модели: 1) в фибробластах разрушали сеть ПФ при помощи доминантно негативного мутанта виментина; 2) использовали фибробласты мыши, лишенные гена виментина, в которых ПФ можно было восстановить при помощи трансфекции рекомбинантного виментина. Анализ подвижности митохондрий в живых клетках при помощи видеомикроскопии показал, что виментиновые ПФ ингибируют транспорт этих органелл вдоль микротрубочек и участвуют в их закоривании на периферии клеток. Ранее было показано, что митохондрии могут связываться с ПФ через плектин, играющий роль посредника. Другие данные косвенно указывают на возможность прямого взаимодействия этих органелл с ПФ. Используя различные мутанты виментина для восстановления ПФ, мы обнаружили, что в ингибировании транспорта митохондрий основную роль играет прямое взаимодействие этих органелл с N-концевой частью молекулы виментина в составе ПФ. Виментин с делецией участка от 44-го до 69-го аминокислоты или с заменой Pro56 на Arg при экспрессии в клетках, лишенных гена виментина, был способен образовывать густую сеть ПФ, которая никак не влияла на подвижность митохондрий. Вместе с тем взаимодействие плектина с такими ПФ также восстанавливалось. Анализ распределения в клетках флуоресцентного белка с пришитым фрагментом молекулы виментина, от наличия которого зависит способность ПФ ингибировать движение митохондрий, показал, что эта часть молекулы содержит сигнал митохондриальной локализации. При экспрессии в клетках такой белок локализуется на митохондриях. Согласно нашим ранее полученным данным, подвижность митохондрий регулируется факторами, влияющими на актиновый цитоскелет. Так, лизофосфатидная кислота, действуя через малую ГТФазу RhoA и связанный с ней белок mDia1, вызывает образование актиновых стресс-фибрилл и подавляет транспорт митохондрий (Minin et al., J. Cell Sci., 2006, 119 : 659—670). Разрушение F-актина при помощи латранкулина B, наоборот, приводит к значительному увеличению подвижности митохондрий. В настоящей работе мы обнаружили, что перестройки актинового цитоскелета влияют на движение митохондрий только в присутствии виментиновых ПФ. Наши данные указывают на то, что виментиновые ПФ регулируют подвижность митохондрий, являясь важным посредником между ними и различными структурами цитоскелета.

**ЛОКАЛИЗАЦИЯ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА В КЛЕТКЕ ПРИ АКТИВАЦИИ СИГНАЛЬНЫХ КАСКАДОВ ТИРОЗИНКИНАЗНЫХ РЕЦЕПТОРОВ.** © *Н. М. Минин*

на,<sup>1</sup> П. А. Тюрин-Кузьмин,<sup>2</sup> А. В. Воротников,<sup>2</sup> В. В. Белоусов.<sup>1</sup> <sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, и <sup>2</sup>Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, tyurinkuzmin. p@gmail.com.

Пероксид водорода ( $H_2O_2$ ) синтезируется в клетках при стимуляции тирозинкиназных рецепторов соответствующими факторами роста.  $H_2O_2$  в этом случае выступает как вторичный мессенджер, инактивируя ряд тирозинфосфатаз. В то же время в клетке содержатся сильные антиоксидантные системы, разрушающие  $H_2O_2$ . Так, пероксиредоксин 2 (Prx2) взаимодействует с  $H_2O_2$  с константой скорости  $2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , в то время как для ключевой тирозинфосфатазы РТР-1В константа скорости составляет  $20 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , а концентрация в клетке Prx2 превышает концентрацию РТР-1В на два порядка. Тем не менее РТР-1В в клетке окисляется при физиологической стимуляции рецепторных тирозинкиназ. Одним из возможных механизмов взаимодействия  $H_2O_2$  с РТР-1В является локальное повышение концентрации  $H_2O_2$  вблизи субстрата. Prx2 в этой области клетки окисляется, и так как его восстановление тиоредоксином происходит сравнительно медленно, избыток  $H_2O_2$  взаимодействует с РТР-1В. Целью нашей работы было изучение внутриклеточной локализации и диффузии  $H_2O_2$ , синтезируемого NADPH-оксидазой при стимуляции тирозинкиназных рецепторов PDGFR в фибробластах 3T3 и EGFR в эпителиальных клетках HeLa. Мы изготовили набор вариантов биосенсора HyPer с различной внутриклеточной локализацией. Генетически кодируемый биосенсор HyPer обладает высокой чувствительностью и специфичностью к  $H_2O_2$ , изменяя спектр возбуждения флуоресценции при взаимодействии с последним. Полученные варианты биосенсора мы экспрессировали в клетках линий HeLa и 3T3 и наблюдали за изменением спектральных характеристик биосенсора в режиме реального времени при помощи флуоресцентной микроскопии. По изменению соотношения пиков возбуждения флуоресценции биосенсора мы детектировали изменения уровня  $H_2O_2$  в различных компартментах клетки при стимуляции факторами роста. Мы обнаружили, что при стимуляции эпителиальных клеток EGF  $H_2O_2$  синтезируется NADPH-оксидазой, которая расположена в клатриновых эндосомах, содержащих интернализированный EGFR. Около плазматической мембраны уровень  $H_2O_2$  практически не изменяется, что свидетельствует о том, что  $H_2O_2$  в клетке выделяется локально и не распространяется по всей цитоплазме. Напротив, в фибробластах после их стимуляции PDGF  $H_2O_2$  синтезируется в основном вблизи плазматической мембраны. В обоих случаях  $H_2O_2$  продуцируется также на мембране эндоплазматического ретикула. Таким образом, полученные нами данные позволяют утверждать, что при стимуляции рецепторных тирозинкиназ ростовыми факторами  $H_2O_2$  продуцируется и действует локально в отдельных компартментах клетки. Диффузия  $H_2O_2$  между компартментами клетки ограничена.

**АКТИНОВЫЙ ЦИТОСКЕЛЕТ В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ** © О. А. Петухова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Актиновые филаменты вместе с микротрубочками и промежуточными филаментами образуют динамическую

сеть в цитоплазме клеток, называемую цитоскелетом, которая определяет форму клетки и лежит в основе клеточной миграции, участвует в межклеточной адгезии и адгезии клеток к матриксу. Актиновый цитоскелет является динамической структурой, обладающей способностью быстро перестраиваться под влиянием внешних и внутренних стимулов за счет взаимопревращений глобулярной и фибриллярной форм актина. Имеются данные, свидетельствующие об участии актинового цитоскелета в процессах проведения внутриклеточного сигнала. В частности, некоторые сигнальные молекулы способны непосредственно взаимодействовать с белками актинового цитоскелета на определенных этапах передачи сигнала от клеточной мембраны к ядру. Дополнительным фактом, указывающим на участие актинового цитоскелета в регуляции экспрессии генов, является открытие внутриядерных функций актина и актинсвязывающих белков. В литературе представлены также данные, демонстрирующие роль актинового цитоскелета в распределении РНК в цитоплазме. Взаимосвязь активности транскрипционных факторов и динамики актинового цитоскелета была показана для нескольких факторов транскрипции. Одним из транскрипционных факторов, регуляция которого может осуществляться в связи с реорганизацией актинового цитоскелета, является NF-κB. Наши собственные данные демонстрируют участие актинового цитоскелета, в том числе α-актининов, в перераспределении р65-субъединицы NF-κB и регуляции ДНК-связывающей активности NF-κB в клетках эпидермоидной карциномы человека A431. Результаты иммунофлуоресцентной микроскопии и биохимического анализа субклеточных фракций демонстрируют существование в цитоплазме как связанного с актиновыми структурами пула р65, так и несвязанного (диффузного). На всех этапах реорганизации актинового цитоскелета, вызванных как адгезией к фибронектину, так и воздействием ЭФР, р65 в цитоплазме обнаруживался в связи с F-актином, в области стресс-фибрилл и раффов. Помимо этого, р65 выявлялся в дискретных актинсодержащих областях, названных пэтчами, в которых присутствовали также белки, характерные для комплексов, связанных с фокальной адгезией. Накопление р65 под влиянием ЭФР в областях, связанных с фокальной адгезией, свидетельствует в пользу того, что присутствие р65 в этих областях является одним из этапов активации NF-κB в клетках A431. Накопление р65 в ядре через 30 мин воздействия ЭФР, по-видимому, не связано с присутствием в клетках A431 стресс-фибрилл и раффов. В чем заключаются различия между пулом р65, направляемым в ядро, и пулом р65, ассоциированным с актинсодержащими структурами в цитоплазме, остается пока невыясненным.

**ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНО-НАПРАВЛЕННЫХ АНТИОКСИДАНТОВ НА КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК НЕЙРОБЛАСТОМЫ.** © Ю. С. Рыбакова, Л. В. Домнина, В. Б. Дугина. НИИ ФХБ им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, julie\_ribakova@yahoo.com.

Нейробластома относится к нейроэндокринным опухолям периферической нервной системы и состоит из нейробластов, недифференцированных клеток—предшественников симпатических нейронов. Нейробласты, как и большинство опухолевых клеток, характеризуются поте-

рей способности отвечать на некоторые виды регуляторных сигналов и терминально дифференцироваться, а также измененными пролиферативными свойствами и повышенным уровнем активных форм кислорода (АФК). Последние играют роль вторичных мессенджеров во многих сигнальных путях, влияя на клеточную пролиферацию, миграцию и выживаемость клеток, принимая участие, возможно, и в процессах канцерогенеза. Изменения уровня АФК наблюдаются в процессе развития и дифференцировки клеток головного мозга. В нашей работе было исследовано воздействие митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 и его аналогов на клетки линии N-18-1 мышинной нейробластомы, а также линий IMR-32 и SK-N-SH нейробластом человека. Были изучены происходящие при этом морфологические изменения и реорганизации цитоскелетных структур. Определение степени дифференцировки клеток проводилось с помощью морфологических исследований и иммуноморфологических тестов на наличие или уровень экспрессии специфических маркеров. Мы показали, что воздействие исследуемых веществ на клетки нейробластомы в культуре приводит к морфологической дифференцировке клеток, которая выражается в образовании и удлинении отростков, а также к появлению маркеров нейрональной дифференцировки — бета-III-тубулина и нейрофиламентов. Было выявлено уменьшение количества клеток под действием SkQ1 и его аналогов по сравнению с контролем, доля митотических клеток при этом не менялась. Также мы обнаружили, что под действием митохондриально-направленных антиоксидантов происходит увеличение количества многоядерных клеток, главным образом двужядерных. Нами сделано предположение о том, что SkQ1 и его аналоги, по-видимому, вызывают блокирование завершающих стадий митоза, скорее всего стадии цитокинеза, приводя к уменьшению количества опухолевых клеток в культуре.

**БЕЛОК EIF3K КАК ПОСРЕДНИК ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОМПОНЕНТОВ СТРЕССОВЫХ ГРАНУЛ С МОТОРОМ МИКРОТРУБОЧЕК ДИНЕИНОМ.** © А. А. Саблина,<sup>1</sup> П. А. Иванов.<sup>2</sup> <sup>1</sup>Факультет биоинженерии и биоинформатики и <sup>2</sup>Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, sabli-naaaa@mail.ru.

Стрессовые гранулы (СГ) — скопления мРНК, малых субъединиц рибосом, компонентов аппарата инициации трансляции и некоторых других белков, имеющие размер порядка 1 мкм и возникающие в цитоплазме эукариотических клеток при различных стрессовых воздействиях, таких как окислительный стресс, гипоксия, тепловой шок, вирусная инфекция, блокирование катаболизма. Они играют важную роль в обеспечении жизнеспособности клеток в критических условиях, поэтому знания о механизме формирования СГ, способах его нарушения или стимуляции найдут широкое применение в фармакологии, например при лечении ишемий или разработке схем химиотерапии. В нашей лаборатории показано, что микротрубочки необходимы для формирования и разборки СГ, а также играют важную роль в их движении (Ivanov et al., 2003, *Exp. Cell Res.*, 290 : 227—233). Было высказано предположение о том, что компоненты СГ при их формировании связываются вместе моторами цитоскелета. Поскольку было показано, что субъединица К фактора инициации транс-

ляции 3 (eIF3K, eIF3 S12 и PLAC-24) взаимодействует с промежуточной цепью моторного белка микротрубочек динеина (DIC) (Karki et al., 2002, *Mol. Biol. Cell*, 13 : 1722—1734), мы предположили, что именно этот белок является посредником при связывании с компонентами СГ с одним из моторных белков — динеином. В структуру белка eIF3K входят 3 домена: НАМ (HEAT-analogous motif, аминокислотные остатки 1—130), имеющий сходство с доменами, участвующими в белок-белковых взаимодействиях, WH (winged helix, остатки 133—188), аналогичный РНК-связывающим доменам, и малоструктурированный С-концевой домен (остатки 191—219). Совокупность доменов НАМ и WH соответствует домену PCI, который участвует в белок-белковых взаимодействиях. В клетках, обработанных арсенитом, иммуноцитохимически выявлены скопления белка eIF3K, по размеру, форме и расположению в клетке напоминающие СГ. При одновременной экспрессии в клетке меченных различными флуоресцентными белками eIF3K и маркера и индуктора СГ PABP (polyA-binding protein) видны колокализация первого белка с СГ при несильной гиперэкспрессии, а также большое содержание его в ядре. Это показывает, что eIF3K может входить в состав СГ. В настоящей работе также оценивали влияние экспрессии доменов НАМ, WH, PCI и С-хвостового, а также полноразмерного eIF3K, слитых с флуоресцентными белками, на формирование СГ в клетках HeLa. Для выявления СГ использовали иммунофлуоресцентное окрашивание на eIF3A, а в качестве контроля — экспрессию чистых флуоресцентных белков. Экспрессия всех доменов eIF3K, а в особенности НАМ и WH, угнетала вызванное обработкой арсенитом образование СГ. Это может свидетельствовать о так называемом доминантно-негативном эффекте, являющемся следствием конкуренции отдельных доменов с полноценным белком за сайты связывания на белках-партнерах. При отсутствии стрессового воздействия экспрессия eIF3K-GFP увеличивала долю клеток с СГ. Копреципитация экспрессированной в *Escherichia coli* DIC человека на глутатион-агарозе с экспрессированными в *E. coli* доменами PCI и С-концевым белком eIF3K человека показала, что связывание происходит только в первом случае. Следовательно, посттрансляционные модификации и наличие С-хвостового домена не являются необходимыми для взаимодействия eIF3K с DIC. Полученные данные указывают на важность eIF3K в формировании СГ, а также подтверждают его присутствие в СГ и взаимодействие с DIC, что может указывать на роль этого белка как посредника при взаимодействии компонентов СГ с динеином.

**ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССА РАСПЛАСТЫВАНИЯ И ДВИЖЕНИЯ ФИБРОБЛАСТОВ В НОРМЕ И В ПРИСУТСТВИИ НОКАДОЗОЛА.** © А. В. Творогова, И. А. Воробьев. НИИ ФХБ им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

Распластывание на адгезивном субстрате является важной частью жизнедеятельности фибробластов, однако его динамика была описана сравнительно давно и без использования современных технических возможностей. В настоящей работе для детального анализа распастьвания и изучения роли микротрубочек в этом процессе использовали клетки культуры Vero, распастьвающиеся на стекле в норме и в условиях деполимеризации микротрубочек нокадозолом (4 мкг/мл). Запись изображения



проводилась с интервалами между кадрами 1 мин с объективом 20× (фазовый контраст) на инвертированном микроскопе Nikon TE-2000 с термостатируемым столиком. Продолжительность цейтраферной записи составляла не менее 10 ч. Всего было исследовано 121 клетка, распластавшаяся в нормальной среде, и 116 клеток, распластавшихся в присутствии нокадазола. Процесс распластывания клеток Vero неоднороден и сильно различается от клетки к клетке как в норме, так и в присутствии нокадазола. В норме большая часть клеток (60 %) начинает распластывание (формирует одну или несколько ламелл) в первые 2 ч после прикрепления к стеклу. У распластывающихся клеток можно выделить две фазы: первая — быстрое увеличение площади (продолжительностью 1—1.5 ч) и вторая — дальнейшее медленное распластывание, занимающее 8 ч и более. Через стадию радиального распластывания проходят только 30 % клеток. Остальные клетки сразу образуют 2—3 ламеллоподии, расположенные на разных концах клетки, и распластывание идет сразу в двух направлениях. В итоге при переходе к движению клетки достигают различной конечной площади, и можно выделить три субпопуляции клеток: хорошо распластанные (площадью более 2000 мкм<sup>2</sup>), умеренно распластанные (площадью 1000—2000 мкм<sup>2</sup>) и слабо распластанные (до 1000 мкм<sup>2</sup>). Деполимеризация микротрубочек приводит к следующим отклонениям. Процесс распластывания идет медленнее и более равномерно, чем в нормальных условиях. Клетки проходят более продолжительную стадию блеббинга и выдвижения псевдоподий. Стадия радиального распластывания отсутствует. Распластывание начинается с выдвижения ламеллоподий сразу в нескольких направлениях. Затем клетка образует ламеллу, одну или несколько, в некоторых случаях круговую. Часть клеток (15 %) остается в течение 16 ч и более неполяризованной, сохраняя радиальную ламеллу на протяжении многих часов, и 10 % могут после начального распластывания необратимо ошариваться. Движение клеток различается в норме и при деполимеризации микротрубочек. Клетки в норме движутся поступательно и могут менять направление движения. В присутствии нокадазола поляризованные фибробласты не способны эффективно перемещать свой центр масс, движение клеток сводится к образованию и исчезновению ламелл и стабильных краев, клетки образуют длинные отростки, иногда тело клетки оказывается разделенным на связанные тонким цитоплазматическим мостиком части, которые в дальнейшем объединяются.

**РОЛЬ ДИНАМИЧЕСКОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ МИКРОТРУБОЧЕК В ПОВЕДЕНИИ ЛАМЕЛЛЫ ФИБРОБЛАСТОВ.** © А. В. Творогова, И. А. Воробьев. НИИ ФХБ им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета.

Способность к движению является одним из главных свойств фибробластов. Воздействие на фибробласты агентами, деполимеризующими микротрубочки, приводит к потере полярности и выполазания фибробластов в рану (Vasiliev et al., 1970). Низкие дозы цитостатиков нокадазола и таксола также блокируют клеточную миграцию без деполимеризации микротрубочек (Liao et al., 1995; Mikhailov, Gundersen, 1998; Григорьев и др., 1999). Поэтому в настоящей работе мы исследовали формирование ламеллоподий как основных модулей, обеспечиваю-

щих миграцию фибробластов в норме, при полной деполимеризации микротрубочек (нокадазол, 4 мкг/мл) и при подавлении их динамической неустойчивости (сочетание низких концентраций нокадазола и таксола, 100 и 50 нМ соответственно). Фильмы были получены методом цейтраферной съемки с интервалом между кадрами 1 с, продолжительностью 650 кадров. Для изучения активного края использовался метод построения кимограмм перпендикулярно различным участкам ведущего края клеток, что позволило проанализировать различные участки ламеллы. Фибробласты, распластанные в нормальных условиях, имеют классический вид: стабильный край, тело и ведущий край. Окраска антителами к  $\alpha$ -тубулину показывает нормальное радиальное строение сети микротрубочек. На кимограммах выдвижение ламеллоподий выглядит как симметричная волна. Наряду с выдвижением ламеллоподий выявляются быстрые колебания мембраны, невидимые при прямом наблюдении. Ламеллоподии достигают длины 3.4 мкм; средняя продолжительность их существования — 56.4 с. Частота возникновения ламеллоподий на клетку составляет в среднем 10 шт./мин. Активность ламеллы неравномерна по ее длине, существуют спокойные (с низкой частотой возникновения ламеллоподий) и активные (с высокой частотой ламеллоподий) области. Частота возникновения ламеллоподий на разных участках ламеллы может колебаться от 0.18 до 0.83 шт./мин. На стабильном краю ламеллоподиальной активности нет. Фибробласты, распластанные в присутствии высоких концентраций нокадазола, встречаются двух морфологических типов: с круговой ламеллой (неполяризованные) и поляризованные. Ламелла клеток формирует на краю «опухолевидные» образования, которые исчезают, растворяясь в цитоплазме. Выдвижение ламеллоподий на кимограмме выглядит как симметричная невысокая продолжительная волна. Образование ламеллоподий нарушено, они короткие (1.5 мкм) и долгоживущие (~90 с). Частота возникновения ламеллоподий резко снижена, не превышая значения 4 шт./мин на клетку. Фибробласты, распластанные в присутствии низких концентраций нокадазола и таксола, морфологически сходны с клетками, распластанными в нормальных условиях. Окраска антителами к  $\alpha$ -тубулину выявляет изменения в системе микротрубочек — их сеть становится более хаотичной по сравнению с нормой. У фибробластов, распластанных в условиях подавления динамической неустойчивости микротрубочек, на краю ламеллы образуются ламеллоподии длиной 2.2 мкм и временем существования 54 с. Частота возникновения ламеллоподий существенно меньше, чем в норме и сравнима с таковой в высоких концентрациях нокадазола. Таким образом, подавление динамической неустойчивости микротрубочек значительно снижает способность ламеллы к формированию ламеллоподий.

**ДЕЙСТВИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ НА НОРМАЛЬНЫЕ И ТРАНСФОРМИРОВАННЫЕ ФИБРОБЛАСТЫ В КУЛЬТУРЕ.** © Е. В. Титова, О. Ю. Иванова, Е. Н. Попова, О. Ю. Плетюшкина, В. Б. Дугина. НИИ ФХБ им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

Известно, что реорганизация актинового цитоскелета при опухолевой трансформации ведет к нарушению поля-

ризации и распластывания клеток, усилению клеточной подвижности. Одно из объяснений нарушения организации актиновой системы заключается в активации онкогенных сигнальных путей клетки, а также в изменении спектра экспрессии актинсвязывающих белков, таких как миозин (Chiavegato et al., 1996), гельзолин (Mullauer et al., 1990) и тропомиозин (Prasad et al., 1993). Целью данной работы являлось изучение действия митохондриально-направленных антиоксидантов (SkQ1 и его аналогов) на нормальные (MRC5) и трансформированные (MRC5-V1 и MRC5-V2) легочные фибробласты человека. Особое внимание было уделено оценке изменения цитоскелетной системы, адгезионных структур и клеточной подвижности. С помощью метода морфометрии было показано, что инкубация нормальных и трансформированных клеток с митохондриально-направленными антиоксидантами (20–40 нМ, от 5 ч до 3–7 сут) способствует распластыванию и образованию пучков актиновых микрофиламентов. Иммуноморфологический анализ показал, что обработка клеток MRC5-V1 и MRC5-V2 митохондриально-направленными антиоксидантами ведет к увеличению толщины и количества пучков актиновых микрофиламентов и их упорядоченному расположению, поляризации клеток. В пучках микрофиламентов выявлялись бета-актин, миозин II, альфа-актинин, гельзолин, а также альфа-гладкомышечный актин. Было показано, что действие N-ацетилцистеина и тролокса на клетки MRC5-V1 схоже с эффектом митохондриально-направленных антиоксидантов, однако рабочие концентрации данных веществ были существенно больше и составляли 5 мМ и 100 мкМ соответственно. С помощью иммуноморфологического и морфометрического анализа было показано, что действие SkQ1 и его аналогов на трансформированные фибробласты приводит к удлинению фокальных контактов и появлению зрелых фокальных контактов, характерных для нормальных клеток. Качественный анализ содержания белка фокальных контактов винкулина методом иммуноблоттинга подтвердил увеличение количества винкулина в клетках MRC5-V1 после инкубации с митохондриально-направленными антиоксидантами (20–40 нМ), N-ацетилцистеином (5 мМ, 7 сут) и тролоксом (100 мкМ, 7 сут). N-ацетилцистеин и тролокс оказывают схожий с SkQ1 и его аналогами эффект на увеличение содержания винкулина в клетках. При динамическом наблюдении за культурами трансформированных фибробластов MRC5-V1 и MRC5-V2 было замечено, что обработка SkQ1 приводит к поляризации клеток, частичной стабилизации края и снижению псевдоподиальной активности. Обработка трансформированных фибробластов митохондриально-направленными антиоксидантами в нашей экспериментальной системе вызывала морфологическую реверсию фенотипа, что согласуется с полученными ранее данными на модели gas-трансформированных клеток (Alexandrova et al., 2006; Porova et al., 2006). С помощью иммунофлуоресцентного и морфометрического анализа нами было показано, что эффект, вызываемый антиоксидантом SkQ1, частично снимается добавлением в культуральную среду рецептора к TGF- $\beta$ 2. С помощью метода проточной цитофлуориметрии были исследованы параметры клеточного цикла клеток культур MRC5-V1 и MRC5-V2. Предварительные данные говорят о появлении выраженной популяции полиплоидных и многоядерных клеток большего объема в культурах трансформированных фибробластов, обработанных SkQ1. Изучаются возможные механизмы морфофункцио-

нальных изменений трансформированных фибробластов под действием митохондриально-направленных антиоксидантов.

**АКТИНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ТЕРМОЛИЗИНОПОДОБНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕАЗ БАКТЕРИЙ РОДА *SERRATIA* КАК ВОЗМОЖНЫЙ ФАКТОР ИХ ВИРУЛЕНТНОСТИ.** © С. Ю. Хайтлина,<sup>1</sup> Т. Н. Ефремова,<sup>1</sup> Е. С. Божокина,<sup>1</sup> О. А. Цапина,<sup>1</sup> И. В. Демидюк,<sup>2</sup> С. В. Костров,<sup>2</sup> Л. В. Кевер,<sup>1</sup> Я. Ю. Комиссарчик.<sup>1</sup> <sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, skhspb@yahoo.com, и <sup>2</sup>Институт молекулярной генетики РАН, Москва.

Большинство термолизиноподобных протеаз обладает широкой субстратной специфичностью. Однако протеаза ECP32/тримелизин, внутриклеточный фермент бактерий *Serratia grimesii*, проявляет весьма узкую специфичность по отношению к нативным белкам. Среди более чем 30 проверенных до сих пор нативных белков субстратами протеазы ECP32 оказались только актин, гистоны, мелиттин и белок теплового шока бактерий DnaK. В молекуле актина ECP32/тримелизин расщепляет пептидную связь Gly42—Val43; образовавшиеся фрагменты не подвергаются дальнейшему протеолизу и остаются нековалентно связанными друг с другом. Расщепление связи Gly42—Val43 приводит к обратимой потере способности актина к полимеризации. ECP32/тримелизин является гомологом протеализина, термолизиноподобной металлопротеазы *S. proteamaculans*, от которого он отличается 8 аминокислотными заменами. Протеализин также расщепляет актин ограниченно. Способность ферментов к ограниченному протеолизу, при котором сохраняется функциональная активность актина, мы назвали актиназной активностью. Известные актиноподобные белки бактерий не содержат аминокислотных последовательностей, соответствующих сайту расщепления актина исследуемыми протеазами. Поэтому мы предположили, что природным субстратом этих протеаз может быть актин эукариот. В пользу этого свидетельствуют полученные нами данные конфокальной и электронной микроскопии, демонстрирующие, что природные и рекомбинантные бактерии, лизаты которых обладают актиназной активностью, способны проникать в эукариотические клетки, вызывая реорганизацию актинового цитоскелета. Эти данные указывают на то, что термолизиноподобные металлопротеазы *Serratia* участвуют в процессе интернализации бактерий и что ограниченный протеолиз актина может быть частью этого процесса.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 08-04-00408 и 09-04-00734).

**ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ ТИРОЗИНКИНАЗЫ РЕЦЕПТОРА ЭФР И MAP-КИНАЗ ERK1/2 НА РЕОРГАНИЗАЦИЮ СИСТЕМЫ МИКРОТРУБОЧЕК В ХОДЕ ЭНДОЦИТОЗА ЭФР-РЕЦЕПТОРНЫХ КОМПЛЕКСОВ.** © М. В. Харченко, М. В. Злобина, Е. С. Корнилова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Традиционно считается, что в процессе эндоцитоза тубулиновый цитоскелет выполняет роль «рельсов», по которым везикулы движутся от периферии клетки к ядру.

При этом предполагали, что система микротрубочек (МТ) в интерфазных клетках в ходе эндоцитоза не изменяется. Однако в клетках линии HeLa после стимуляции эндоцитоза ЭФР мы наблюдали перестройку сети МТ. В то время когда ЭФР находился в ранних эндосомах, МТ располагались радиально — от околядерной области к периферии клетки, как и в клетках до стимуляции эндоцитоза. В процессе превращения ранних эндосом в поздние сеть МТ реорганизовывалась. Число длинных радиальных МТ уменьшалось, а интенсивность окрашивания тубулина вокруг ЦОМТ усиливалась. В целом система приобретала «губкоподобный» вид (спутанная сеть МТ), отдельные МТ укорачивались, возможно, фрагментировались и даже частично деполимеризовались. Когда поздние эндосомы, содержащие ЭФР, взаимодействовали с лизосомами и ЭФР деградировал, сеть МТ возвращалась к исходному облику. В отсутствие эндоцитоза подобных изменений цитоскелета не наблюдали. Есть основания полагать, что перестройка сети МТ связана со стимуляцией эндоцитоза. Задача настоящей работы заключается в выявлении сигналов, регулирующих процесс ремоделирования МТ. Эти сигналы могут, в частности, стимулироваться самим грузом, т. е. в нашем случае — рецептором ЭФР. Мы использовали два ингибитора: тирфостин AG1478, который блокирует тирозинкиназную (ТК) активность самого рецептора ЭФР, и UO126, который подавляет активность МАР-киназы ERK1/2, регулируемой в том числе и сигналами, идущими с активированного рецептора ЭФР. Были выявлены два сигнала, вызывающих реорганизацию сети МТ. Во-первых, оказалось, что присутствие ингибитора AG1478 в первые 5 мин после стимуляции эндоцитоза предотвращало последующую реорганизацию сети МТ. Добавление AG1478 на более поздних стадиях эндоцитоза не препятствовало изменениям тубулинового цитоскелета. Таким образом, активация ТК-рецептора в течение первых 5 мин после начала эндоцитоза существенна для стабилизации «ранней» радиальной сети МТ. Этот сигнал генерируется на плазматической мембране и начальных стадиях эндоцитоза. Во-вторых, обнаружено, что под действием ЭФР в клетках HeLa активация ERK1/2 происходит в две волны — как на ранней стадии эндоцитоза, так и на стадии, соответствующей пребыванию ЭФР-рецепторных комплексов в поздних эндосомах. Подавление фосфорилирования киназы ERK1/2 ингибитором UO126 никак не влияло на реорганизацию сети МТ при добавлении его на ранних стадиях процесса. Однако UO126 препятствовал фрагментации/деполимеризации тубулинового цитоскелета, когда его добавляли через 30 мин после запуска эндоцитоза (стадия созревания поздних эндосом). Следовательно, активация ERK1/2 на стадии поздних эндосом необходима для продолжения разборки микротрубочек. Наши данные свидетельствуют о том, что процесс реорганизации системы МТ в интерфазных клетках при действии ЭФР может находиться под контролем нескольких различных сигналов, действующих на разных стадиях эндоцитоза.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 06-04-49046-а и 09-04-01215-а) и ГК ФЦП № 02.512.12.0024 «Молекулярная и клеточная биология».

**АЛЬФА-АКТИНИН-4 УЧАСТВУЕТ В ЯДЕРНЫХ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСАХ, РЕГУЛИРУЮЩИХ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ.** © М. Г. Хотин, Л. В. Туроверова, В. Ю. Аксенова, А. В. Соловьева, Г. П. Пинаев, Д. Г. Тентлер. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Актиновый цитоскелет принимает участие в передаче сигнала от поверхности клетки в ядро. Его перестройки в ответ на изменение микроокружения сопровождаются перераспределением транскрипционных факторов и изменением экспрессии генов. Известно, что многие актинсвязывающие белки, равно как и сам актин, имеют не только цитоплазматическую, но и ядерную локализацию. Однако неясно, какие функции они там выполняют. Одним из таких белков является  $\alpha$ -актинин-4. Полученные ранее данные о его локализации с р65-субъединицей транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B в цитоплазме и ядре позволили предположить участие  $\alpha$ -актинина-4 в регуляции активности NF- $\kappa$ B. Вместе с тем ядерные функции  $\alpha$ -актинина-4 требуют подробного изучения. Одним из подходов при анализе ядерных функций белка является исследование ядерных белковых комплексов. Нами проведен анализ состава ядерных белковых комплексов  $\alpha$ -актинина-4 методами двумерного электрофореза и масс-спектрометрии. Обнаружено, что в ядре клеток A431 с  $\alpha$ -актинином-4 ассоциировано примерно 50 различных белков. Из них нами идентифицированы:  $\beta$ -актин;  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулины; белки гетерогенного рибонуклеопротеинового семейства (hnRNP) A2/B1, A1, A3, K и L; пероксиредоксин-1; D-3-фосфоглицериндегидрогеназа; TAP ДНК-связывающий белок 43; поли(rC)-связывающий белок 1. Известные ядерные функции этих белков связаны с процессингом и транспортом мРНК, регуляцией транскрипции генов. Полученные результаты позволяют предположить, что  $\alpha$ -актинин-4 принимает участие в этих процессах. В предыдущих работах нами показано, что в ядрах клеток A431 присутствуют полноразмерная и две укороченные изоформы  $\alpha$ -актинина-4. Методами иммунопреципитации и иммуноблоттинга на клетках линии A431 установлено, что с  $\alpha$ -тубулином связаны только укороченные изоформы  $\alpha$ -актинина-4, а на клетках линии HEK-293, трансфицированных экспрессионными плазмидами, содержащими полноразмерную или укороченную изоформу  $\alpha$ -актинина-4, показано, что с гетерогенными рибонуклеопротеинами A2/B1 и A1 ассоциирована только его полноразмерная изоформа. Это свидетельствует о включении  $\alpha$ -актинина-4 в различные белковые комплексы, которые выполняют, по-видимому, различные функции в ядре. На клетках линии A431, культивируемых на различных белках внеклеточного матрикса, установлено существование корреляционной связи между включением  $\alpha$ -актинина-4 в комплекс с р65-субъединицей NF- $\kappa$ B в ядре и экспрессией некоторых генов-мишеней р65-субъединицы.

**ВИМЕНТИНОВЫЕ ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ ФИЛАМЕНТЫ КОНТРОЛИРУЮТ МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МИТОХОНДРИЙ.** © И. С. Черношваненко,<sup>1</sup> А. А. Минин.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН и

<sup>2</sup>Институт белка РАН, Москва.

Многие функции митохондрий зависят от их способности генерировать и поддерживать на определенном уровне трансмембранный электрохимический потенциал. Благодаря потенциалу эти органеллы являются основным



источником АТФ в клетке, регулятором концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме, а также играют роль в развитии апоптоза. Потенциал митохондрий находится под контролем многих внешних и внутренних факторов, одним из которых является их взаимодействие с цитоскелетом. Настоящая работа была посвящена выяснению роли цитоскелета в регуляции потенциала митохондрий, который анализировали при помощи потенциалзависимых красителей. Оказалось, что стационарные митохондрии обладают более высоким мембранным потенциалом, чем подвижные в тех же клетках. По ранее полученным нами данным, взаимодействие митохондрий с виментиновыми промежуточными филаментами (ПФ) ингибирует подвижность этих органелл и участвует в их распределении. Мы решили проверить, как взаимодействие митохондрий с ПФ влияет на их потенциал. Наши данные свидетельствуют о том, что восстановление ПФ в клетках, лишенных гена виментина, приводит к значительному увеличению потенциала митохондрий. Этот эффект обусловлен взаимодействием митохондрий с ПФ, а не снижением их подвижности, так как разрушение микротрубочек в клетках подавляет их движение, но не влияет на потенциал. Восстановление в клетках ПФ при помощи форм виментина с мутациями в N-концевой части молекулы, лишенных способности связываться с митохондриями, не влияло на их потенциал. Это указывало на роль в этом процессе прямого взаимодействия виментина с митохондриями. Действительно, искусственный белок, состоящий из флуоресцентного белка Dendra2, сшитого с фрагментом виментина, который способен связываться с митохондриями, также увеличивал их потенциал при экспрессии в клетках. Таким образом, наши данные показывают, что виментиновые ПФ являются еще одним фактором, контролирующим потенциал митохондрий.

**ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНО-НАПРАВЛЕННЫХ АНТИОКСИДАНТОВ НА КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК РАКА ШЕЙКИ МАТКИ ЛИНИЙ SiHa И C33A И ЛИНИИ КЕРАТИНОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА HaCaT.**  
© Г. С. Шагиева, Е. Н. Попова, Л. В. Домнина, О. Ю. Плетюшкина, В. Б. Дугина. НИИ ФХБ им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

При опухолевой трансформации большое значение имеют процессы изменения цитоскелета и усиления подвижности клеток, которые лежат в основе способности

опухолевых клеток к инвазии и метастазированию. Отмечено действие антиоксидантов на цитоскелет трансформированных клеток, заключающееся в частичной реверсии морфологической трансформации и снижении клеточной подвижности. Качественно новым классом синтетических антиоксидантов являются митохондриально-направленные антиоксиданты, имеющие в своем составе специфические катионы, обеспечивающие быстрое и обратимое накопление антиоксидантов в митохондриях, что повышает эффективность их действия. В нашей работе был проведен иммуноморфологический и биохимический анализ изменений цитоскелета и межклеточных адгезионных структур у клеток рака шейки матки человека линий SiHa и C33A и спонтанно иммортализованных кератиноцитов человека линии HaCaT под действием митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 и его аналогов. Также было исследовано влияние антиоксиданта SkQ1 на скорость роста клеток линий SiHa и HaCaT в культуре. Было показано, что инкубация клеток культуры SiHa и C33A с митохондриально-направленными антиоксидантами приводила к упорядоченному расположению пучков актиновых микрофиламентов, увеличению их толщины и количества, а также к образованию актинсодержащих тангенциальных межклеточных контактов, локализованных с белками адгезионных межклеточных контактов. Происходили рекрутирование E-кадгерина и концентрация  $\alpha$ -катенина в область межклеточных контактов под влиянием SkQ1 и его аналогов. Эффекты фенотипической нормализации наблюдались также под влиянием N-ацетилцистеина и тролокса. Было отмечено ингибиторное влияние антиоксиданта SkQ1 и его аналогов на скорость роста клеток культуры SiHa. На клетки культуры HaCaT антиоксидант SkQ1 заметного влияния не оказал. Методом белкового иммуноблоттинга было показано, что обработка клеток культуры SiHa митохондриальными антиоксидантами ведет к увеличению общего содержания E-кадгерина, который в настоящее время рассматривается как опухолевый супрессор. Уровень E-кадгерина в клетках культуры HaCaT после инкубации с SkQ1 и его аналогами не менялся. Наблюдалось увеличение уровня альфа-катенина в клетках C33A при обработке SkQ1. Выявленные изменения морфологии, организации актинового цитоскелета и межклеточных контактов, а также увеличение экспрессии E-кадгерина и альфа-катенина продемонстрировали способность митохондриально-направленных антиоксидантов индуцировать процессы эпителиальной дифференцировки неопластически трансформированных клеток в культуре.