

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ И СООБЩЕНИЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫХ НА II КОНФЕРЕНЦИЮ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ИНСТИТУТА ЦИТОЛОГИИ РАН

(Санкт-Петербург, 15—16 февраля 2010 г.)

ИЗОФОРМЫ АКТИНСВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА АЛЬФА-АКТИНИНА 4 (ACTN4) В ЛИНИИ ЭПИДЕРМОИДНОЙ КАРЦИНОМЫ ЧЕЛОВЕКА (A431). © В. Ю. Аксенова, М. Г. Хотин, Л. В. Туроверова, Г. П. Пинаев, Д. Г. Тентлер. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, vasilisina@gmail.com.

Альфа-актинин 4 (ACTN4) относится к актинсвязывающим белкам спектринового суперсемейства. Основными его функциями считаются формирование и стабилизация актиновых фибрилл и фокальных контактов, однако показано, что он также может принимать участие в некоторых ядерных процессах. Наследственные мутации в последовательности гена *ACTN4* приводят к специфическому нарушению развития почек у человека. Некоторые соматические мутации *ACTN4* ассоциируют со способностью определенных типов раковых опухолей к метастазированию и связаны с изменением его основной цитоплазматической локализации на ядерную. Кроме того, появляются данные о присутствии в различных типах клеточных культур и злокачественных новообразований нескольких альтернативных изоформ ACTN4, специфичных для данного типа клеток.

Из пре-мРНК гена *ACTN4* предположительно может быть образовано более 11 типов мРНК, из которых 9 вариантов могут потенциально кодировать функциональные белки. Однако в клетках высших эукариот выделен и описан только 1 вариант мРНК, кодирующий полноразмерный белок ACTN4 размером ~105 кДа. Тем не менее за последние несколько лет в различных клеточных линиях обнаружено присутствие дополнительных изоформ ACTN4, образующихся путем альтернативного сплайсинга. Так, в клетках эпидермоидной карциномы человека линии A431 нами было выявлено несколько изоформ мРНК гена *ACTN4*. Кроме того, было показано, что одна из этих изоформ образуется в результате альтернативного сплайсинга. В ней отсутствует участок с 221-го по 879-й нуклеотид, затрагивающий район со 2-го по 8-й экзон включительно. Сопоставление данного района мРНК с последовательностью белка, которую он должен кодировать, показало, что район делеции приходится строго на два кальпониновых домена, принимающих участие в связывании ACTN4 с F-актином. Данный укороченный и полноразмерный варианты мРНК гена *ACTN4* были клонированы в вектор pCS2MT в одной рамке считывания с последовательностью, кодирующей маркерный пептид МҮС, с помощью которого проводили определение внут-

риклеточной локализации данной изоформы белка методом иммунофлуоресценции. Было выявлено, что данная изоформа белка имеет преимущественно ядерную локализацию в отличие от полноразмерного варианта, связанного в основном с фибриллами актина и местами образования фокальных контактов. Кроме того, методом иммуноблоттинга было показано, что в отличие от полноразмерной изоформы ACTN4 укороченный вариант в меньшей степени взаимодействует с hnRNP A2/B1 и A1, участвующими в биогенезе пре-мРНК, которые ранее в нашей лаборатории уже были выявлены в составе ядерных белковых комплексов, содержащих ACTN4. Следует отметить, что данная укороченная изоформа ACTN4 не была выявлена в линии HEK293, где экспрессируется только полноразмерный вариант мРНК.

Далее мы предполагаем провести исследование нескольких других клеточных культур и определить, являются различия, полученные на данных клеточных линиях, результатом тканеспецифического сплайсинга, или специфической особенностью клеток A431, или связаны со злокачественной природой данной клеточной линии. Кроме того, предполагается провести анализ других укороченных изоформ ACTN4 в клетках линии A431, выявить их внутриклеточную локализацию и специфические для них функции. Таким образом, результаты, полученные в ходе работы, позволят не только более подробно охарактеризовать изоформы ACTN4, специфичные для клеток линии A431, но и выявить, характерны ли некоторые из них для определенных типов нормальных клеток человека.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-01190-а) и СПбГУ 2/11 КЦ (Carl Zeiss).

СТАРЕНИЕ ФИБРОБЛАСТОВ МЫШЕЙ ЛИНИИ SHR, ПОЛУЧАВШИХ МЕТФОРМИН В ТЕЧЕНИЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ВРЕМЕНИ. © А. В. Аркадьева,¹ В. Н. Анисимов,² И. М. Спивак.¹ ¹ Институт цитологии РАН и ² Институт онкологии РАМН, Санкт-Петербург, asarkad@yandex.ru.

Метформин — это бигуанид, традиционно используемый как противодиабетический препарат. В опытах, проведенных в лаборатории В. Н. Анисимова Института онкологии РАМН на экспериментальных животных, обнаружили, что длительный прием метформина приводит к

резкому повышению средней и максимальной продолжительности жизни. Для изучения действия метформина на клеточном уровне мы получили первичные фибробласты из кончиков хвостов контрольных мышей и подопытных мышей линии SHR, получавших метформин в течение жизни с питьевой водой в дозе 1200 мг/л ежедневно. Мы исследовали мышей в возрасте 11, 16, 19 и 23 мес. Были изучены две группы животных: мыши, получавшие метформин с 3-го мес жизни (группа M1), и мыши, получавшие метформин с 9-го мес жизни (группа M2). В полученных фибробластах исследовали площадь ядер, активность SA- β -галактозидазы, количество в ядрах клеток особых гетерохроматиновых структур (SANF) и наличие в ядрах фосфорилированной формы гистона H2AX (γ H2AX). У каждого животного на каждый маркер старения было проанализировано по 100 клеток. При анализе активности SA- β -галактозидазы в клетках мышей подопытных групп нами было выявлено значительно меньшее количество положительных по β -галактозидазе клеток (8.5 против 22 % по сравнению с контролем того же возраста). При анализе таких параметров, как количество SANF в ядрах фибробластах, площадь ядер и наличие в ядрах клеток гистона γ H2AX, мы не получили различий по среднему арифметическому значению между контролем и опытом одного возраста. Однако нами были показаны различия по данным параметрам в максимальном значении, значениях 25 и 75 перцентилей и медиане распределения. По всем трем параметрам с помощью непараметрических критериев Крускала—Уоллиса, Манна—Уитни и Смирнова ($P < 0.05$) было показано, что метформин способствует накоплению «усредненных» клеток и препятствует появлению клеток с большим количеством маркеров старения, замедляет сдвиг распределения вправо, в сторону больших значений.

РОЛЬ ФИБРОБЛАСТОВ ДЕРМАЛЬНОГО ЭКВИВАЛЕНТА В РЕМОДЕЛИРОВАНИИ ЕГО НЕКЛЕТОЧНЫХ КОМПОНЕНТОВ. © *Е. А. Вершевская, Н. М. Юдинцева, Е. В. Воронкова, М. М. Блинова, Г. П. Пинаев.* Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, LisavetaV@gmail.com.

При любом повреждении ткани усиливается активность различных ферментов. В этих процессах участвуют матриксные металлопротеазы (ММП), которые синтезируются организмом и выходят в виде раневого экссудата, характерного для всех видов ран. В ране основными ММП являются ММП-2 и ММП-9. Для заживления ран в настоящее время в клинической практике используют дермальный эквивалент (ДЭ) на основе коллагена I типа. При этом используется коллаген ксеногенного происхождения. В организме естественной средой при заживлении ран являются фибрин и раневой экссудат, выделяющиеся из плазмы крови. И поэтому более адекватным было бы для приготовления ДЭ использовать фибрин.

Целью работы было исследование ремоделирования под влиянием раневого экссудата ДЭ, приготовленного на основе фибриногена (коммерческий препарат, выделенный из плазмы крови человека) с участием дермальных фибробластов человека. В связи с этим были сформулированы следующие экспериментальные задачи: 1) культивирование фибробластов кожи человека в фибриновом геле на протяжении 14 сут с последующим анализом коллагена I типа, ламинина и фибриногена методом иммуноблотинга; 2) анализ методом зимографии ферментатив-

ной активности ММП в ДЭ на основе фибрина с добавлением раневого экссудата.

Первичная культура нормальных фибробластов была получена из кожи человека, взятой в результате косметической операции. Образцы раневого экссудата были получены от пациентов с глубокими обморожениями, поступавших в Региональный ожоговый центр НИИ скорой помощи им. И. И. Джанелидзе. Фибриновый гель получали при смешивании фибриногена в концентрации 10 мг/мл и тромбина. В таком геле культивировали фибробласты в количестве 50 тыс. на лунку в 96-луночной плате в течение 14 сут. В опытных вариантах в питательную среду с эквивалентами добавляли раствор экссудата.

Анализ результатов показал следующее. 1. С увеличением срока культивирования ДЭ на основе фибрина происходит актиновый синтез коллагена I параллельно с деградацией фибриногена, что свидетельствует о процессе ремоделирования внеклеточного матрикса (ВКМ) с участием ММП-2 и ММП-9; синтез ламинина в процессе культивирования практически не менялся. 2. Влияние экссудата на ремоделирование ДЭ: а) динамика синтеза коллагена и деградации фибриногена в вариантах с добавлением и без добавления экссудата была идентичной — увеличивалась по мере срока культивирования; б) активность ММП сохраняла такую же тенденцию — увеличивалась по мере срока культивирования; в) внесение экссудата в ДЭ и, согласно данным зимографии, увеличение активности ММП способствовало меньшему синтезу коллагена I и большей деградации фибриногена; г) преобразование ВКМ связано, в частности, с действием ММП-ферментов, специфически расщепляющих белки ВКМ.

На данном этапе работа практически завершена, но затронутая в ней проблема требует выполнения последующих исследований клеточных механизмов регенерации поврежденной ткани и разработки клеточного продукта ДЭ на основе фибрина и его клинического применения для заживления ран.

ДЕПОЗАВИСИМЫЙ ВХОД КАЛЬЦИЯ В КЛЕТКАХ НЕЙРОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА SK-N-SH, МОДЕЛИРУЮЩИХ БОЛЕЗНЬ ГЕНТИНГТОНА. © *В. А. Вигонт, О. А. Зимина, Л. Н. Глушанкова, А. Ю. Скопин, Е. В. Казначеева.* Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Vvigan@gmail.com.

Кальций регулирует множество важных клеточных процессов: пролиферацию, дифференцировку, апоптоз и многие другие. Повышение концентрации ионов кальция в цитозоле является одним из основных способов передачи сигналов от рецепторов плазматической мембраны к внутриклеточным системам. Такое повышение концентрации может достигаться как за счет выброса кальция из внутриклеточного депо, так и за счет кальция через каналы плазматической мембраны. Одним из типов каналов, осуществляющих вход кальция из внеклеточной среды, являются депозависимые каналы. Для них эти два процесса связаны: опустошение депо вызывает вход кальция через депоуправляемые кальциевые каналы.

Хорея Гентингтона является нейродегенеративным заболеванием, при котором поражаются преимущественно нейроны стриатума. Данное заболевание связано с мутацией гена белка хантингтина, следствием которой является увеличение длины полиглутаминового тракта в N-концевой области белка. В норме длина этого тракта не

должна превышать 35 глутаминовых остатков. В последнее время появляется все больше данных, указывающих на взаимосвязь между нейродегенеративными заболеваниями (в частности, болезни Гентингтона) и нарушениями в кальциевой сигнализации.

В качестве модели болезни Гентингтона была выбрана линия клеток нейробластомы SK-N-SH, в которых был экспрессирован ген мутантного хантингтина со 138 остатками глутамина в тракте (13Q). В качестве контроля использовали клетки той же линии с хантингином, содержащим 15 остатков глутамина в своем полиглутаминовом тракте (15Q). Для исследования депозависимого кальциевого входа в этих клетках опустошение внутриклеточных кальциевых депо вызывали с помощью тапсигаргина. Тапсигаргин является блокатором кальциевых АТФаз эндоплазматического ретикула, и при его использовании кальций выходит из депо пассивно через каналы утечки, что позволяет говорить о наблюдаемом в последующем входе кальция через каналы плазматической мембраны как об исключительно депозависимом.

Было показано, что в клетках 138Q, экспрессирующих мутантный хантингтин, депозависимый вход кальция существенно (в 2,5—3 раза) выше, чем в контрольных клетках 15Q. Дальнейшие исследования показали, что повышение депозависимого входа кальция в клетки 138Q, вероятно, связано не с изменением проводящих свойств имеющихся каналов, а опосредованно увеличением количества кальцийпроницаемых каналов в плазматической мембране данных клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта по Госконтракту № 02.740.11.5007, Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-12035 и гранта НШ-1135.2008.4).

СТРУКТУРА, ФУНКЦИИ И ЛОКАЛИЗАЦИЯ МАЛОГО БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА АЛЬФА-КРИСТАЛЛИНОВОГО ТИПА В КЛЕТКАХ МИКОПЛАЗМЫ *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII*. © И. Е. Вишняков,¹ С. Н. Борхсениус,¹ В. А. Иванов,¹ С. А. Левцкий,² В. Н. Лазарев,² Х. А. Айала,³ Е. С. Снигиревская,¹ Я. Ю. Комиссарчик.¹
¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ² НИИ Физико-химической медицины ФМБА, Москва, и ³ Centro de Biologia Molecular Severo Ochoa, Madrid, Spain, innokenty-vish@rambler.ru.

Малые белки теплового шока альфа-кристаллинового типа (αМБТШ) обнаружены у многих бактерий, животных, растений и у нескольких из исследованных представителей архей. Для большинства членов обширного семейства α-кристаллинов характерны наличие α-кристаллинового домена, способность к образованию олигомеров, включающих в себя до 24 мономеров-субъединиц, и шаперонная активность олигомерной формы. Наличие αМБТШ у некоторых микоплазм впервые было показано в нашей лаборатории.

Целью данной работы было изучение структуры, функций и локализации малого белка теплового шока α-кристаллинового типа (IbpA) в клетках микоплазмы *Acholeplasma laidlawii*.

Белок IbpA экспрессировали в штамме *Escherichia coli* B834 (DE3), трансформированном рекомбинантной плазмидой с геном *IbpA A. laidlawii*. Рекомбинантный IbpA выделяли из клеточного лизата *E. coli* на колонке с

Ni-сефарозой. Препараты очищенного белка (10 мкг/мл) наносили на никелевые сетки с коллоидной пленкой, предварительно выдержанные под ультрафиолетом, и окрашивали водным раствором уранил-ацетата в течение 1—2 мин. Материал просматривали в электронном микроскопе ZEISS LIBRA 120. Были получены электронно-микроскопические изображения комплексов рекомбинантного IbpA *A. laidlawii*, спонтанно сформировавшихся *in vitro* (PBSx1). Комплексы IbpA с диаметром около 15 нм оказались похожими на комплексы, формируемые αМБТШ из риса и дрожжей. Мы предполагаем, что комплексы могут быть активной формой IbpA, выполняющей в клетке шаперонную функцию.

Экспериментально шаперонная функция IbpA была продемонстрирована при индукции его синтеза в трансформированных клетках *E. coli* и выражалась в предотвращении тепловой денатурации некоторых растворимых белков клеточного экстракта *E. coli* и в обеспечении лучшей выживаемости клеток *E. coli*, продуцирующих рекомбинантный IbpA, в условиях сравнительно короткого (40 мин), но сильного (48 °C) теплового стресса.

Было выполнено иммуноцитохимическое исследование локализации белка IbpA в клетках *A. laidlawii*. Кроличьи поликлональные антитела (АТ) индуцировали рядом инъекций, аффинно очищали и использовали для меченя соответствующего белка на ультратонких срезах клеток *A. laidlawii*, зафиксированных 2%-ным раствором формальдегида с добавлением 0.1%-ного глutarальдегида и залитых в акриловую смолу LR-White (Polyscience, INC, США). Иммуноцитохимическую реакцию проводили в соответствии со стандартным протоколом. Вместо вторых АТ использовали конъюгат протеина А с 15-нанометровым коллоидным золотом (EY Laboratories, INC, США). Были сделаны два контроля: АТ либо заменяли неиммунной сывороткой, либо их опускали. Материал просматривали в электронном микроскопе JEM-100U. Было показано, что при нормальных условиях роста культуры IbpA встречается в незначительном количестве на периферии клеток микоплазм. В условиях теплового шока количество IbpA в клетках *A. laidlawii* значительно увеличивается, и можно выделить несколько характерных вариантов локализации белка: 1) в наиболее электронно-плотных участках клеток; 2) в области цитоплазматической мембраны; 3) в ассоциации с некими протяженными структурами в клетках при отсутствии детальной фибриллярной ультраструктуры; 4) в области перетяжек между делящимися клетками. За исключением единичных случаев, IbpA не обнаруживали в центральной области клеток, где располагается нуклеоид.

Из всего вышеописанного видно, что IbpA *A. laidlawii* обладает всеми основными свойствами αМБТШ и, видимо, аналогично другим белкам этого семейства вовлечен в мультишаперонную сеть, обеспечивающую защиту белков и стабилизацию внутриклеточных структур микоплазмы во время стресса.

ПРИРОДА НИЗКОПРОВОДЯЩИХ ПОДСОСТОЯНИЙ α-ГЕМОЛИЗИНОВОГО КАНАЛА. © С. С. Ефимова, О. С. Остроумова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ssefimova@mail.ru.

Одиночный α-гемолизинный канал (*Staphylococcus aureus*) в бислоиных липидных мембранах из дифитаноилфосфохолина, омываемых растворами 1 М КСl

(рН 7.5), при трансмембранных потенциалах $V > |100|$ мВ флуктуирует между основными высокопроводящим (проводимость канала $G = 900 \pm 90$ пСм при $V \rightarrow 0$) и низкопроводящими подсостояниями (G от 50 до 150 пСм) с максимумом плотности вероятности при 100 пСм и средним временем жизни 5 с. Было выдвинуто предположение о том, что наблюдаемая потенциал-зависимость переходов между подсостояниями проводимости α -гемолизинного канала может быть обусловлена перемещением долей воротных частиц под действием трансмембранного потенциала. Для проверки гипотезы использовали дипольные модификаторы, соединения, молекулы которых имеют большой дипольный момент. Как известно, флоретин и флоридзин уменьшают дипольный потенциал мембраны, а 6-кетохолестанол и RH 421 его увеличивают (Andersen et al., 1976; Franklin, Cafiso, 1993; Malkov, Sokolov, 1996). Добавление флоретина в омывающий мембрану раствор (до конечной концентрации 40 мкМ до или 20—40 мкМ после формирования α -гемолизинного канала) способствует переходу в низкопроводящие подсостояния при $V \geq |25|$ мВ. Величины проводимостей всех состояний канала, а также время жизни низкопроводящих подсостояний при этом сохраняются. Добавление флоридзина (20—80 мкМ) или RH 421 (10 мкМ) в мембрано-омывающий раствор до или после формирования α -гемолизинного канала, а также введение 6-кетохолестанола (50 мол %) в мембранообразующий раствор не изменяют перехода канала в низкопроводящие подсостояния. Эти данные позволяют заключить, что изменение дипольного потенциала мембраны, индуцированное дипольными модификаторами, не влияют на воротные свойства альфа-гемолизинного канала, а эффект флоретина можно отнести к специфическому взаимодействию флоретина с каналом. Согласно (Tarahovsky et al., 2008), флаваноиды, к которым относится флоретин, могут специфически взаимодействовать с интегральными мембранными белками, имеющими в своем составе лизин, аргинин (Arg) и гистидин. При встраивании в мембрану комплекса из семи молекул α -гемолизина происходит изменение конформации мономеров, в результате чего становятся свободными некоторые участки полипептидной цепи, которые ранее были недоступны для образования связей с флоретином (Song et al., 1996; Kawate, Gouaux, 2003). Анализ расположения аминокислотных остатков в структуре мономеров в водном растворе и в канале, а также водородных связей между протомерами в проводящем комплексе позволяет предположить возможность дополнительного взаимодействия флоретина с Arg₁₀₄ после формирования канала. Поскольку молекула флоретина имеет большой дипольный момент (5.6 Д), такое специфическое взаимодействие флоретина с каналом может приводить к изменению суммарного дипольного момента воротных частиц канала, в результате чего происходит сдвиг трансмембранного потенциала, вызывающего переход канала в низкопроводящие состояния. Таким образом, полученные результаты позволяют считать, что дипольная составляющая воротного механизма α -гемолизинного канала является определяющей при переходе канала в низкопроводящие подсостояния.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 09-04-00883), программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и ГК № П1372 (ФАО).

МЕЖКЛЕТОЧНЫЙ ТРАНСПОРТ ПРОТЕАСОМ КАК ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ПЕРЕНОСА СИГНАЛА. © Ю. Я. Зайкова, А. С. Цимоха, В. А. Куличкова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, julia-vata-jok@mail.cytspb.rssi.ru.

Исследование роли малых некодирующих РНК в основных клеточных процессах продолжает оставаться одной из стремительно развивающихся областей молекулярной и клеточной биологии. Кроме того, появились данные о передаче от клетки к клетке функционально активных микро-РНК через экзосомы. Мы показали, что протеасомной популяцией в клетке ассоциирован набор малых РНК, включающий в себя РНК-транскрипты ретропозона Alu. Исследуемые РНК представлены на автордиограмме дискретным набором малых РНК с размером 20—30 нуклеотидов. Известно, что эукариотические клетки способны выделять в культуральную среду и в межклеточное пространство внутри организма функционально активные протеасомы. Мы показали, что протеасомы способны также быстро проникать из культуральной среды обратно в живые клетки. Более того, протеасомы могут курсировать между клетками различной тканеспецифичности, т. е., поступая в одни клетки, покидают их и импортируются в другие. Поступая в клетки, экзогенные протеасомы оказывают влияние на экспрессию генов-регуляторов апоптоза в клетках-реципиентах. Учтя этот факт, а также то, что с протеасомами ассоциированы различные регуляторные белки и, что крайне важно, малые некодирующие РНК, мы высказали предположение о том, что такие экскретируемые из клеток протеасомы могут играть роль переносчиков информации от клеток-доноров к клеткам-реципиентам.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00834), в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2012 гг. (ГК № 02.740.11.0094 и П1389) и с использованием оборудования ЦКП (Материаловедение и диагностика в передовых технологиях).

ЭНДОЦИТОЗ ЭФР И ТФР- α — НАТИВНЫХ ЛИГАНДОВ РЕЦЕПТОРА c-ErbB1 — ВЫЗЫВАЕТ АЦЕТИЛИРОВАНИЕ МИКРОТРУБОЧЕК. © М. В. Злобина, М. В. Харченко, Е. С. Корнилова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, aquimaria@gmail.com.

Ацетилирование микротрубочек (МТ) в ходе эндоцитоза рецептора эпидермального фактора роста c-ErbB1 изучали методом иммунофлуоресцентной конфокальной микроскопии. Оказалось, что стимуляция эндоцитоза c-ErbB1 при образовании его комплекса с эпидермальным фактором роста (ЭФР) приводит к постепенному увеличению уровня ацетилирования МТ, достигающего максимума через 60—90 мин и затем снижающегося до контрольного уровня. Рецепторсодержащие эндосомы при этом постепенно укрупняются и перераспределяются в околоядерную область. К 60—90 мин крупные эндосомы формируют плотные кластеры вокруг центра организации микротрубочек (ЦОМТ). Другой нативный лиганд c-ErbB1 — трансформирующий фактор роста (ТФР- α), вызывающий преимущественно рециклирование рецептора, а не его деградацию, как в случае с ЭФР, — также

инициирует волну ацетилирования, но эффект выражен слабее, и эндосомы в этом случае не укрупняются и не формируют плотных скоплений в области ЦОМТ. После обработки клеток ингибитором деацетилаз трихостатином А (TSA) вся популяция МТ в клетке ацетилирована. В этих условиях транслокация эндосом, содержащих комплекс с-ErbB1 с ЭФР, носит такой же характер, как и в не обработанных ингибитором клетках, однако размер эндосом не увеличивается по мере их перемещения в околоядерную область. Ацетилирование особенно ярко выражено на сильно искривленных участках МТ, которые располагаются ближе к ЦОМТ и формируют там спутанную сеть.

В соответствии с существующими представлениями, ацетилирование происходит на стабильных МТ, по которым осуществляется везикулярный транспорт. Предполагается, что с таким МТ преимущественно взаимодействует моторный белок кинезин, в нашем случае опосредующий рециклирование. Тогда следовало бы ожидать, что ацетилирование МТ под воздействием ТФР- α должно быть более интенсивным по сравнению с ЭФР. Однако наши данные противоречат этому предположению. Мы считаем, что в эпителиальных клетках линии HeLa ацетилирование МТ после стимуляции эндцитоза рецептора с-ErbB1 отражает возникновение популяции стабильных искривленных МТ, связанных не столько с перемещением по ним рецепторсодержащих эндосом к центру клетки или от него, сколько с поддержанием слияния эндосом, достигающих определенной степени зрелости в случае ЭФР, но не созревающих до нужного состояния под действием ТФР- α .

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-01215а), программы президиума РАН МКБ и программы президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-3273.2010.4).

РОЛЬ КОРТАКТИНА В РЕГУЛЯЦИИ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ (ENaC). © Д. В. Илатовская,¹ Ю. А. Негуляев,¹ А. В. Старуценко.² ¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и ² Кафедра физиологии Медицинского колледжа Висконсина, Милуоки, США, daria.ilatowska@gmail.com.

Эпителиальные натриевые каналы (ENaC) играют важную роль в поддержании гомеостаза натрия в организме; повышенная экспрессия ENaC обнаружена, например, в собирательных трубочках почки и дистальном нефроне, эпителии легких и толстой кишки. Как и многие другие ионные каналы, ENaC регулируются кортикальным актиновым цитоскелетом. Один из ключевых белков, взаимодействующих с F-актином, — кортактин, который является важным участником многих клеточных процессов, таких как, например, клеточная подвижность, эндцитоз и сборка межклеточных контактов. Данное исследование обращено к роли кортактина в регуляции ENaC. Нами была показана высокая экспрессия кортактина *in vitro* методом иммуноблоттинга в иммортализованных клеточных линиях собирательных трубочек почки — mpkCCD_{c14}, M-1 и MDCK, а также иммуногистохимическим окрашиванием *in vivo* в кортикальных собирательных трубочках почки крыс линии Sprague-Dawley. При помощи метода коиммунопреципитации мы выяснили, что кортактин взаимодействует с α -субъединицей ENaC при коэспрес-

сии этих белков в клетках СНО. Эти данные были также подтверждены нами при помощи метода флуоресцентной микроскопии, результаты исследования с помощью которого позволили сделать вывод о высокой степени колокализации всех трех субъединиц ENaC и кортактина. Электрофизиологические исследования методом патч-кламп выявили снижение интегральных токов через ENaC при совместной экспрессии ENaC и кортактина дикого типа в клетках СНО по сравнению с контрольными экспериментами, в которых были экспрессированы только ENaC.

Кортактин взаимодействует с различными важными клеточными белками, например с комплексом Arp2/3, и имеет сайты фосфорилирования для киназ Src и сайт прямого связывания с F-актином, а также связывается с динамином за счет своего домена SH3. Известно, что экспрессия мутантного неактивного динамина (DN K44A) и ENaC в клетках СНО значительно увеличивает токи через каналы по сравнению с контрольным уровнем. Дополнительная экспрессия в этой системе кортактина дикого типа привела к исчезновению эффекта мутантного динамина. Интересно, что совместная экспрессия ENaC и мутантного кортактина, не способного связываться с динамином, оказала на токи через ENaC такое же влияние, что и экспрессия кортактина дикого типа. Аналогично действовали мутантный кортактин с удаленным доменом фосфорилирования и кортактин, не способный взаимодействовать с F-актином. Однако мутант кортактина, не активирующий комплекс Arp2/3, не влияет на активность ENaC. Таким образом, наши результаты показывают, что кортактин важен для регуляции ENaC и что, вероятно, в этот механизм вовлечен комплекс Arp2/3.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-00995).

СРАВНЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ЛИПОПЕПТИДОВ, СУРФАКТИНА И СИРИНГОМИЦИНА Е, В ЛИПИДНЫХ БИСЛОЯХ В ПРИСУТСТВИИ ДИПОЛЬНЫХ МОДИФИКАТОРОВ. © М. Г. Ильин, О. С. Остроумова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ilyne@yandex.ru.

Исследовано влияние дипольмодифицирующих агентов на индуцированную липопептидом *Bacillus subtilis* сурфактином проводимость бислоевых липидных мембран. Добавление сурфактина с обеих сторон липидного бислоя, сформированного из 1, 2-дифитаноил-sn-глицеро-3-фосфохолина в 1 М растворе KCl (pH 6.5), приводит к увеличению мембранной проводимости за счет формирования ионных каналов. Увеличение мембранного дипольного потенциала до 350 ± 40 мВ добавлением RN 421 в омывающий бислой растворы приводит к повышению проводимости мембраны в 40 ± 15 раз. В то же время уменьшение дипольного потенциала до 120 ± 20 мВ введением флоретина приводит к уменьшению индуцированной сурфактином проводимости в 30 ± 15 раз. Можно предположить, что различие каналообразующей активности сурфактина при варьировании дипольного потенциала мембран обусловлено изменением коэффициента распределения сурфактина между липидной и водной фазами. В пользу этого предположения говорит наличие отрицательного заряда у сурфактина; в этом случае увеличение дипольного потенциала может обеспечить увеличение ко-

эффицента распределение липопептида в пользу бислоя. Учитывая, что увеличение дипольного потенциала вызывает уменьшение каналообразующей активности положительно заряженного сириномицина E, в том числе за счет изменения коэффициента распределения можно говорить о ключевой роли заряд-дипольных взаимодействий в каналообразующей активности липопептидов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00883), программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и ГК № П1372 (ФАО).

ЧАСТИЧНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ ГРЫЗУНОВ, ПОЛУЧАЮЩИХ С ПИЩЕЙ ИОНЫ СЕРЕБРА. © Е. Ю. Ильичева,¹ Е. А. Затуловский,^{1,2} А. Н. Скворцов.^{1,3} ¹ Кафедра биофизики С.-Петербургского государственного политехнического университета, ² НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН и ³ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, skvor@mail.cytspb.rssi.ru.

Церулоплазмин (ЦП) — многофункциональный медь-содержащий белок сыворотки крови, обуславливающий ее оксидазную и ферроксидазную активность. ЦП является важнейшим элементом внеклеточной медь-транспортной системы позвоночных. Концентрация меди в крови, концентрация ЦП и оксидазная активность плазмы крови характеризуют статус меди, который приобретает все большее значение в диагностике нарушений метаболизма меди, а также опухолевого роста. В то же время медь-транспортная функция ЦП и связь статуса меди с внутриклеточным метаболизмом меди изучены недостаточно. В настоящей работе мы исследовали модель животных, статус меди которых был снижен за счет введения в корм солей серебра, и частично охарактеризовали ЦП плазмы крови этих животных.

Работу выполняли на крысах линии Вистар и мышцах линии С58В1 получавших с пищей 50 мг AgCl на 1 кг массы тела (Ag-грызуны). Концентрацию металлов измеряли с помощью FAAS, оксидазную и ферроксидазную активность определяли в геле и кинетическими методами с помощью цветных реакций, относительное содержание ЦП-мРНК определяли методом ОТ-ПЦР, содержание полипептида ЦП оценивали методом иммуноблоттинга. Анализ фракций ЦП, очищенных с помощью ионообменной хроматографии, осуществляли с помощью спектроскопии поглощения и кругового дихроизма (КД) в видимом и УФ-диапазонах и методом дифференциальной сканирующей калориметрии.

Через 4 нед Ag-диеты у крыс и 1 нед у мышей оксидазная и ферроксидазная активность ЦП не выявляется. Концентрация меди снижается на 90 % у крыс и на 60 % у мышей. При этом уровень иммунореактивного ЦП в крови и активность гена ЦП в печени не изменяются. По данным иммунопреципитации, серебро, содержащееся в сыворотке крови, почти полностью ассоциировано с ЦП. Церулоплазмин Ag-животных (Ag-ЦП) представлен двумя формами, одна из которых по электрофоретической подвижности соответствует холо-ЦП контрольных животных. Анализ препарата Ag-ЦП показывает наличие слабой оксидазной и ферроксидазной активности, а также

поглощения в области 610 нм (медь типа I). Следы оксидазной активности выявляются в сыворотке кинетическими методами. Все данные свидетельствуют о том, что Ag-ЦП содержит около 1 % молекул ЦП, сохраняющих каталитическую активность. Оставшаяся фракция Ag-ЦП, согласно данным спектроскопии КД и калориметрических исследований, имеет нарушенную, сильно дестабилизированную третичную структуру, но отличается от апо-ЦП и щелочно-денатурированного белка. Оксидазная активность Ag-ЦП не восстанавливается при добавлении ионов меди. Полученные результаты находятся в соответствии с предположением о том, что Ag(I), являющееся электронным аналогом Cu(I), может транспортироваться в печень и включаться в ЦП в комплексе Гольджи, поэтому ЦП теряет свою функциональность. Этим, возможно, обусловлена низкая токсичность серебра для позвоночных. При этом в течение всего эксперимента продолжает образовываться небольшое количество ЦП, сохраняющего атомы меди и оксидазную активность. Проведенные исследования представляют интерес как в связи с механизмами встраивания меди в ЦП и формирования холо-ЦП, так и в связи с разработкой животной модели с регулируемым статусом меди.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 09-04-01165а и 09-04-01406а).

АНАЛИЗ САТЕЛЛИТНОЙ ДНК В ГЕНОМЕ МЫШИ. © А. С. Комиссаров, И. С. Кузнецова, О. И. Подгорная. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ad3002@gmail.com.

Гетерохроматиновая часть генома мыши практически не изучена. Наименее изученной частью генома мыши являются центромерные и перичентромерные районы хромосом. В отсековенном геноме мыши собранные хромосомы заканчиваются на перичентромерных последовательностях. Тем не менее еще не собранные в хромосомы отсековенные геномные последовательности обогащены не только мажорным (maSat) и минорным (miSat) сателлитами мыши, но и другими сателлитными ДНК (satДНК), до сих пор не охарактеризованными. Целью представленной работы является характеристика как известных (maSat и miSat), так и ранее не описанных satДНК. Отсековенные satДНК мы искали с помощью программы TRF (Tandem repeats finder; Benson, 1999) в базе данных WGS (Whole Genome Sequences; NCBI, 2009). Суммарно база данных WGS представлена 1 775 878 последовательностями, общим размером более 6.5 млрд н. п. Среди найденных 1 944 018 различных тандемных повторов мы отобрали тандемные повторы с размером поля более 3000 н. п., таких последовательностей оказалось 1012. Эти последовательности были попарно выровнены и разделены на 64 группы, среди которых было выделено 7 классов satДНК, различающихся по следующим характеристикам: GC-содержанию, размеру мономера, степени гомологии между отдельными мономерами, наличию HOR (High Order Repeats) и расположению на хромосомах. Из 7 классов только 2 содержат уже известные satДНК — класс maSat и класс miSat. Главное различие между этими классами — вариабельность мономера: 60—95 % для maSat и больше 95 % для miSat. MaSat в отсековенном геноме представлен как высокомолекулярными тандемными полями, так и полями с

гомологий менее 65 %. Среди всех найденных сатДНК 77.4 % являются маСат. МиСат формирует 1 % найденных сатДНК. Кроме известных сатДНК были выявлены ранее описанные в литературе у человека (Warburton, 2008) LTR-содержащие сатДНК с мономером более 1000 п. н. (5 % от найденных сатДНК). Около 2 % найденных сатДНК формируют класс перичентромерных сатДНК с размером мономера 21 п. н. Этот класс предположительно присутствует в перичентромерном районе большинства хромосом. Класс сатДНК, сформированный простыми повторами, представлен только 1 % от найденных сатДНК. Еще 3 % представлены уникальными сатДНК, выявленных в одном экземпляре. СатДНК с мономером от 17 до 58 н. п. формируют класс, занимающий 6 % от найденных сатДНК, на собранном *in silico* геноме. Последовательности этого класса специфичны для хромосом или для групп хромосом. Ответить на вопрос о том, хромосом-специфичны ли они *in vivo*, можно будет только после экспериментальной проверки.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ПОПУЛЯЦИИ ПРОТЕАСОМ.
© Б. М. Кравец, Ю. Я. Зайкова, А. С. Цимоха, В. А. Куличкова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

26S-протеасомы, осуществляя специфический протеолиз регуляторных белков, участвуют в контроле над продвижением клетки по фазам клеточного цикла, дифференцировкой, транскрипцией, проведением сигнала, апоптозом, иммунным ответом. Согласно современным представлениям, в клетке популяция протеасом по составу и специфичности протеолитической активности гетерогенна. Было показано, что протеасомы экскретируются клетками, и кроме того, были выявлены различия в количестве протеасом, выделяемых нормальными и опухолевыми клетками. Мы показали, что протеасомы, покидая клетку, сохраняют свойственные им разнообразные ферментативные активности. Протеасомы из среды, кондиционированной клетками A431, проявляют значительно более высокую химотрипсин-подобную пептидазную активность, чем цитоплазматические частицы из этих же клеток. При действии ЭФР наблюдается противоположное соотношение: цитоплазматические частицы проявляют более высокую активность этого типа. Кроме того, мы показали, что ЭФР вызывает изменение специфичности пептидазных активностей протеасом и в цитоплазме клеток A431 — повышение всех трех типов пептидазных активностей при наиболее эффективной стимуляции активности химотрипсин-подобного типа. Однако протеасомы из среды, кондиционированной стимулированными ЭФР клетками, проявляют более низкие пептидазные активности (при минимальной активности химотрипсин-подобного типа), чем цитоплазматические частицы из тех же клеток. Это позволяет предположить, что одним из механизмов регуляции активности протеасом в клетке может быть избирательная секреция клетками специфической субпопуляции этих частиц. Так, селективная экскреция из клеток под влиянием ЭФР специфической субпопуляции протеасом (или одного типа частиц), имеющих низкую активность типа химотрипсина, может привести к повышению активности той популяции протеасом, которая останется в клетке.

Анализ эндорибонуклеазной активности протеасом показал, что внеклеточные протеасомы отличаются от ци-

топлазматических протеасом и по РНКазной активности. Действие ЭФР резко меняет РНКазную активность протеасом, экскретируемых из клеток A431. Так, под влиянием ЭФР из клеток выделяются частицы с низкой РНКазной активностью, в то время как из контрольных клеток экспортируются высокоактивные частицы. Поскольку ЭФР вызывает повышение РНКазной активности протеасом в цитоплазме, можно предположить, что выделение клеткой в культуральную среду низкоактивной субпопуляции приводит к повышению активности цитоплазматических протеасом. Вследствие выделения из контрольных клеток высокоактивной популяции в их цитоплазме могут оставаться частицы с низкой активностью.

При сравнении субъединичного состава протеасом цитоплазматических и внеклеточных наблюдаются различия в наборе изоформ субъединиц протеасом, что, по всей видимости, объясняется различиями в их функциях.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00834) в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 гг. (ГК № 02.740.11.0094 и П1389) и с использованием оборудования ЦКП «Материаловедение и диагностика в передовых технологиях».

ПОВЫШЕННЫЙ ВЫХОД КАЛЬЦИЯ ИЗ ДЕПО ЧЕРЕЗ РИАНОДИНОВЫЙ РЕЦЕПТОР В НЕЙРОНАХ СТРИАТУМА МЫШИ ПРИ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА.
© С. В. Львовская,¹ И. Б. Безпрозванный.² ¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и ² Юго-Западный медицинский центр университета Далласа, США, vetalvovskaya@gmail.com.

Болезнь Хантингтона (БХ) — аутосомно-доминантное нейродегенеративное заболевание. На ранних этапах этой болезни у пациентов наблюдается селективная потеря ГАВА-ергических срединных шипиковых нейронов (MSN). На молекулярном уровне БХ вызывается увеличением (*exp*) полиглутаминового повтора (*polyQ*) в N-конце хантингтина (*Htt*). Вопрос о том, как именно мутации в хантингтине приводят к развитию заболевания, на данный момент остается открытым. Согласно одной из ведущих теорий, причиной поражения MSN при БХ являются нарушения в механизме нейронального кальциевого сигналинга.

В настоящей работе сопоставлена активность важного участника кальциевого сигналинга — рианодинного рецептора (*RyR*) в MSN, содержащих и не содержащих *Htt^{exp}*.

Для сравнения величины выхода кальция из депо через *RyR* в MSN, экспрессирующих *Htt^{exp}*, с MSN, не имеющими этого белка, была проведена серия экспериментов на первичной культуре MSN из трансгенных мышей YAC128 — мышью модели БХ и мышью дикого типа (*WT*).

Для оценки цитоплазматической концентрации кальция использовался флуоресцентный кальциевый зонд *Fura2*. Для статистического сравнения данных использовался однофакторный дисперсионный анализ (*one-way ANOVA*).

Для инициирования выхода кальция из депо во внеклеточный раствор добавляли мембранопроникающий активатор *RyR* кофеин. Поскольку в нервной системе *RyR*

работает как Ca^{2+} -индуцируемый Ca^{2+} -канал (CICR), аппликация только 2.5 мМ кофеина не вызвала увеличения количества Ca^{2+} в цитоплазме. Для достижения уровня концентрации кальция в цитоплазме, достаточной для открытия CICR, вместе с кофеином во внеклеточный раствор добавляли глутамат.

Чтобы отделить изменения в цитоплазматической концентрации кальция, обусловленные глутаматиндуцированным кальциевым ответом, от результата выхода кальция из депо через RyR , была проведена серия экспериментов по аппликации к клеткам глутамата. Концентрация глутамата 2.5 мкМ во внеклеточном растворе приводила к достоверному увеличению количества кальция в цитоплазме ($P < 0.01$) в YAC128 и WT MSN. Разница между максимальными и базальными соотношениями 340/380 была примерно 0.07—0.11 (0.10±0.02 для YAC128 и 0.08±0.02 для WT). Достоверного различия между изменением цитоплазматической концентрации кальция в YAC128 и WT MSN не наблюдалось.

Совместная аппликация 2.5 мкМ глутамата и 2.5 мМ кофеина вызывала кальциевый ответ в обеих культурах нейронов ($P < 0.01$). Разница между максимальными и базальными соотношениями 340/380 была 0.43±0.04 для YAC128 и 0.21±0.02 для WT. Это свидетельствует о значительно большем (4 раза для YAC128 и 2 раза для WT) повышении цитоплазматической концентрации кальция, чем наблюдалось при аппликации одного лишь глутамата ($P < 0.01$). Также видно усиление кальциевого ответа в YAC128 MSN по сравнению с WT в 2 раза ($P < 0.01$). Таким образом, величина выхода кальция из депо через RyR в YAC128 MSN примерно в 2.5 раза больше, чем в WT.

Из полученных результатов можно сделать вывод о значительном усилении функции RyR как Ca^{2+} -канала эндоплазматического ретикула в MSN при экспрессии в клетке Htt^{exp} . Это указывает на наличии вклада RyR в нарушении нейронального кальциевого сигналинга при БХ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-011224), гранта НШ-1135.2008.4 и ГК № 02.740.11.5007.

ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ STAT3 И STAT5 В ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК ХРОНИЧЕСКОЙ ЛЕЙКЕМИИ K562. © Е. В. Митюшова, Н. Д. Аксенов, И. И. Марихова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, elena-mityushova@yandex.ru.

Оптимальная активность нерецепторных тирозинкиназ семейства JANUS (JAK) и транскрипционных факторов семейства STAT является необходимым условием успешной передачи пролиферативного сигнала при взаимодействии цитокина с рецептором плазматической мембраны. Нарушение функционирования этого пути лежит в основе различных заболеваний, таких как лейкемии, лимфомы, иммунодефицит. Показано, что в трансформированных лимфоидных клетках белки STAT (преимущественно STAT3) находятся в гиперактивном состоянии. В нашей работе охарактеризована роль сигнального пути JAK/STAT в пролиферации клеток хронической лейкемии K562. Активность белков семейства STAT оценивали по количеству фосфорилированных по тирозину форм STAT3 и STAT5. В пролиферирующих культурах клеток K562 выявлен высокий уровень фосфорилирования

STAT3 и STAT5. Для выяснения роли этих белков в поддержании пролиферативного статуса культур K562 использовали ингибиторы JAK/STAT-пути: AG-490, ингибирующий в разных клетках тирозинкиназы JAK2 и (или) JAK3, и WHI-P131, ингибитор, специфичный к тирозинкиназе JAK3, которая в Т-лимфоцитах ассоциирована с рецептором интерлейкина-2. Установлено, что длительное (48 ч) ведение клеточных культур в присутствии использованных ингибиторов не сопровождается гибелью клеток. Обнаружено, что WHI-P131 снижает уровень фосфорилирования STAT5 (но не STAT3) и останавливает рост культур K562. Цитометрический анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла в культуре K562, растущей в присутствии WHI-P131 (30—100 мкМ), показал дозозависимое снижение доли клеток в фазах G₁ и S и отсутствие существенных изменений в структуре клеточного цикла при ведении культур K562 с AG-490 (25—50 мкМ). Полученные данные указывают на ключевую роль STAT5 в поддержании пролиферативного статуса культур клеток хронической лейкемии K562 и выявляют специфику ингибирующего действия WHI-P131: в отличие от других ранее испытанных ингибиторов тирозинкиназ семейства JAK, которые стимулируют апоптотическую гибель клеток, WHI-P131 останавливает клеточный рост, задерживая клетки в постсинтетических фазах G₂/M клеточного цикла.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы «Молекулярная и клеточная биология» и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00492-а).

ВЛИЯНИЕ ИНДУКЦИИ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК В КЛЕТКАХ K562 ДОКСОРУБИЦИНОМ НА СВОЙСТВА И ЭНДОРИБОНУКЛЕАЗНЫЕ АКТИВНОСТИ АЛЬФА-СУБЪЕДИНИЦ ПРОТЕАСОМ. © Т. Н. Моисеева,¹ А. Г. Миттенберг,¹ Н. А. Барлев.^{1,2} ¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и ² Университет Лестера, Великобритания, t.n.moiseeva@gmail.com.

Протеасома представляет собой рибонуклеопротеиновый комплекс, который встречается во всех эукариотических клетках. Наибольший интерес протеасомы вызывают в связи с открытием убиквитинзависимого механизма расщепления белков, благодаря которому эти протеолитические комплексы принимают участие в регуляции большого количества процессов на всех этапах жизни клетки. Кроме того, было показано участие протеасом и их компонентов в регуляции транскрипции, а также обнаружены АТФ-зависимая геликазная активность протеасом и их способность к расщеплению некоторых РНК. Совмещение такого множества важнейших функций делает протеасому незаменимым участником регуляции экспрессии генов при любом изменении физиологического состояния клетки. В данной работе рассматривается такое воздействие на клетки, как индукция повреждений ДНК доксорубицином, которая приводит к апоптозу.

Для изучения изменений, происходящих в протеасомах при индукции повреждений ДНК, субъединицы протеасом, выделенных из цитоплазмы и ядер контрольных и обработанных доксорубицином клеток K562, были разделены с помощью двумерного электрофореза. Пятна, соответствующие, по предварительным данным, субъединицам 20S-протеасомы, были вырезаны из геля и исследова-

лись с помощью масс-спектропии, что позволило выявить различие в посттрансляционных модификациях некоторых субъединиц до и после воздействия доксорубина. Это может свидетельствовать о регуляции активностей протеасомы для более эффективного участия в таком изменении физиологического состояния клетки, как апоптоз.

Для проверки этой гипотезы из пятен на геле после двумерного электрофореза, соответствующих альфа-субъединицам протеасом, были экстрагированы белки, которые затем исследовались на наличие РНКазных активностей по отношению к мРНК р53 человека, полученной в результате транскрипции *in vitro* в присутствии радиоактивно меченного ЦТФ, в различных условиях. Все исследованные субъединицы проявили способность к расщеплению предложенного субстрата в некоторых условиях, однако предпочтительные условия оказались различными для различных субъединиц, а также изменялись после воздействия на клетки доксорубина.

Согласно литературным данным, субъединица $\alpha 5$ протеасом присутствует в клетке в свободном виде и даже в этом состоянии сохраняет способность к расщеплению РНК. Мы проверили наличие альфа-субъединиц в клетке вне протеасом и исследовали распределение их по фракциям с различными плотностями. Данное распределение оказалось различным для разных белков, а также изменялось для некоторых субъединиц после воздействия на клетки доксорубина, что может свидетельствовать о включении каталитически активных протеасомных субъединиц в комплексы для регуляции их роли в контроле экспрессии генов при данном изменении физиологического состояния клетки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00834) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

ОЛИГОМЕРЫ VASP1 ФОРМИРУЮТ ИОННЫЕ КАНАЛЫ В ЛИПИДНЫХ БИСЛОЯХ. © О. С. Остроумова,¹ В. В. Захаров,² Л. В. Щагина,¹ М. И. Мосевичкий.² ¹ Институт цитологии РАН и ² Петербургский институт ядерной физики РАН, Санкт-Петербург, osostroumova@mail.ru.

Целью работы являлось установление возможностей образования ионных каналов сигнальными белками аксонных окончаний нейронов VASP1. Показано, что олигомеры VASP1 образуют ионные каналы в отрицательно заряженных фосфолипидных бислоях, омываемых 0.2 М раствором KCl (рН 7.5), как в случае введения белоксодержащих липосом, так и при непосредственной добавке VASP1 в околочелювные растворы (1—15 мкМ).

Меньшая вероятность образования VASP1-каналов в мембранах из эквивалентной смеси фосфатидилсерина и фосфатидилэтаноламина по сравнению с фосфатидилхолинсодержащими мембранами указывает на ключевую роль фосфатидилхолина в формировании VASP1-каналов. VASP1-каналы демонстрируют многоуровневую проводимость. Наиболее часто регистрируются каналы малой проводимости (порядка 50 пСм), однако большие подуровни проводимости (до нескольких сотен пСм) также наблюдаются достаточно часто. Вольт-амперная характеристика мультиканальной мембраны линейна, что

указывает на линейность вольт-амперных характеристик подуровней проводимости VASP1-каналов. Результаты электронно-микроскопических методов исследования свидетельствуют об образовании подуровней проводимости VASP1-каналов за счет разного числа мономеров, формирующих поры. Большое время задержки между добавкой белка и появлением каналов при непосредственном введении белка в околочелювные растворы по сравнению с добавкой липосом говорит о том, что введенный в раствор VASP1 встраивается в мембрану в мономерной форме, а сборка проводящих олигомеров разного диаметра происходит уже на липидной поверхности. Показана преимущественно катионная селективность VASP1-каналов (число переноса для калия 0.9 ± 0.1). Установлено отсутствие зависимости кинетики открывания/закрывания VASP1-каналов от знака и величины трансмембранного потенциала. Полученные данные позволяют заключить, что VASP1-каналы являются потенциалнезависимыми.

Из полученных результатов следует, что олигомеры VASP1 формируют в липидных бислоях ионные каналы, аналогичные по своим свойствам трансмембранным порам, образуемым некоторыми амилоидными белками. Таким образом, результаты работы представляют интерес для понимания общих закономерностей образования олигомерных комплексов сходной структуры белками, имеющими различную природу и физиологические функции, в том числе амилоидными белками, являющимися причиной нейродегенеративных заболеваний.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00883), программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и ГК № П1372 (ФАО).

β -КАТЕНИН И Gsk3 β ФОРМИРУЮТ В МЕЗЕНХИМНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТКАХ КОМПЛЕКСЫ, ВКЛЮЧАЮЩИЕ В СЕБЯ РАЗЛИЧНЫЕ ФОРМЫ p130. © Н. С. Петров, О. В. Жидкова, Б. В. Попов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, mickola@inbox.ru.

Сопряжение пролиферации и дифференцировки в большинстве клеточных линий основано на образовании супрессорного комплекса p130—E2f4, который транскрипционно подавляет синтез множества белков, регулирующих ход клеточного цикла, и останавливает клетки в фазе G₀/G₁. Мы нашли, что в мезенхимных стволовых клетках (МСК), активированных к эпителиальной дифференцировке путем кокультивирования с клетками линии A-549 или при росте в среде с ионами лития, происходят накопление и активация p130, E2f4 и β -катенина, что не сопряжено с торможением клеточного цикла. МСК подобно эмбриональным стволовым клеткам не останавливают пролиферацию в условиях дефицита ростовых факторов и не активируют ее при рестимуляции фетальной сывороткой. Синхронизация МСК путем обработки тимидином и нокодазолом в фазах G₀/G₁ и M не сопровождается изменением уровня и рисунка фосфорилирования p130 в противоположность мышинным гепатоцитам и клеткам линии T98G, которым свойственно накопление форм 1 и 2 p130 в покое и формы 3 при активной пролиферации. Антитела к p130 или β -катенину преципитируют из экстрактов активированных литием МСК форму 2

p130, взаимодействующую с гиперфосфорилированием β -катенином. В МСК формируются различные комплексы Gsk3 β — β -катенин, в которых p130 присутствует в форме 1 или 2. Образование различных комплексов Gsk3 β —p130— β -катенин, возможно, соответствует их различной функциональной роли в ходе клеточного цикла МКС.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00595).

РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ БЕЛКИ У ИНFUЗОРИЙ. © А. Ю. Пименов, С. О. Скарлато. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, iamshura@yahoo.com.

Представления о механизмах регуляции транскрипции и строении основного промотора генов, кодирующих белки эукариотических организмов, базируются на данных, полученных с использованием различных методов направленного мутагенеза (экспериментальный подход). По мере накопления информации о степени консервативности этих элементов появилась возможность перейти в ряде случаев к теоретическому анализу, выражающемуся в сопоставлении нуклеотидных последовательностей промоторных областей исследованных генов с нуклеотидными последовательностями хромосом, не подвергавшихся экспериментальному изучению (сравнительно-молекулярный подход). Однако переход от экспериментального к сравнительно-молекулярному методу изучения ДНК сопровождается внесением вероятной ошибки в исследование, которая обусловлена отсутствием четких представлений о внутренней нуклеотидной структуре элементов регуляции, минимальных последовательностях, необходимых для регуляции транскрипции, а также об их разнообразии в различных группах организмов. В результате в литературе накапливается большое количество противоречащих друг другу данных о строении промоторных областей генов эукариот, не подкрепленных экспериментальной проверкой. Это делает необходимым четкое ограничение рамок использования сравнительного подхода, а также уточнение принципов планирования экспериментов.

В настоящей работе на основе новых экспериментальных данных, полученных в результате исследования гена $\alpha 1$ -тубулина инфузории *Stylonychia lemnae*, установлено, что промоторы генов, кодирующих белки инфузорий, могут быть подразделены на три основные группы: а) промоторы, построенные по классической схеме, характерной для многих эукариот, и содержащие только ТАТА-бокс и инициатор; б) промоторы, также характерные для многих эукариот и содержащие наряду с ТАТА-боксом и инициатором ряд дополнительных регуляторных элементов, таких как СААТ-бокс, GC-бокс, различные энхансеры и репрессоры; в) промоторы, содержащие специфические регуляторные нуклеотидные последовательности, характерные для некоторых генов и групп инфузорий.

На основе данных о разнообразии промоторных областей генов класса II инфузорий предложена схема совместного использования экспериментального и сравнительно-молекулярного методов изучения регуляции транскрипции как представителей типа Ciliophora, так и эукариот в целом. Построен алгоритм планирования экс-

периментальной основы для сравнительно-молекулярных исследований ранее не изученных генов эукариот.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ БЕЛКА Gadd45 α НА АНТИПРОЛИФЕРАТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ ИНГИБИТОРОВ HDAC В E1A + Ras-ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТАХ. © А. К. Пожидаева, М. В. Абрамова, С. Б. Светликова, В. А. Поспелов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, leff0308@mail.ru.

Ингибиторы гистоновых деацетилаз (HDAC) представляют собой новый класс противоопухолевых агентов. Предотвращая деацетилирование гистонов, они способствуют деконденсации хроматина и активации транскрипции ряда пролиферативных генов, экспрессия которых подавлена в опухолевых клетках (Rosato et al., 2003). Однако точечные механизмы антипролиферативного действия ингибиторов HDAC остаются невыясненными.

Gadd45 α известен как белок, индуцируемый различными ДНК-повреждающими факторами и стрессами, которые сопровождаются блоком пролиферации (Kastan et al., 1992). Ранее была установлена роль Gadd45 α в таких клеточных процессах, как пролиферация, репарация ДНК, контроль клеточного цикла и апоптоз (Gartier et al., 1994).

Нами была установлена корреляция во времени между запуском программы ускоренного старения мышечных эмбриональных E1A + Ras-трансформированных фибробластов, индуцированного продолжительным воздействием ингибиторов HDAC трихостатином А (TSA) и бутиратом натрия, и накоплением белка Gadd45 α . Необратимость пролиферативного блока, а также появление маркера клеточного старения (окрашивание на β -галактозидазу) наблюдались только после обработки TSA трансформантов E1A + Ras не менее 72 ч. Соответственно транскрипция гена *gadd45 α* увеличивалась постепенно в зависимости от времени воздействия TSA, тогда как белковый продукт детектировался только через 72 ч. Данные иммунофлуоресцентной микроскопии показывают, что белок Gadd45 α , накопленный через 72 ч действия TSA, локализуется в основном в примембранной области ядра трансформантов E1A + Ras.

Учитывая показанную ранее роль белков семейства Gadd45 α в клеточном старении (Bulavin et al., 2003), мы исследовали влияние ингибиторов HDAC на пролиферацию клеток, не экспрессирующих белок Gadd45 α (Gadd45 α -/-). Методом проточной цитофлуориметрии было показано, что в отсутствие в клетках белка Gadd45 α не приводит к исчезновению индуцированного ингибиторами HDAC блока клеточного цикла. Однако снижение доли клеток в фазе S в клетках Gadd45 α -/- наступает спустя большее время инкубации с ингибиторами и менее выражено. При этом в клетках Gadd45 α -/- наблюдалось очень слабое окрашивание на SA- β -Gal через 48 ч и оставалось неизменным при дальнейшей обработке TSA. Полученные данные свидетельствуют о том, что отсутствие Gadd45 α снижает способность ингибиторов HDAC вызывать старение клеток.

Анализ цитофлуориметрического распределения клеток Gadd45 α -/- по содержанию ДНК выявляет индуцированное ингибиторами HDAC увеличение субдиплоидного пика, характеризующего дробление ДНК при апоптозе. Данные колориметрического анализа каспазной активности показывают, что бутират натрия не влияет на активность каспазы-3 в исходных фибробластах E1A + Ras,

тогда как в клетках, не экспрессирующих Gadd45a, каспаза-3 активируется в десятки раз, что свидетельствует о запуске ингибиторами HDAC апоптотической гибели трансформантов E1A + Ras (Gadd45a/-).

Таким образом, в зависимости от присутствия белка Gadd45a в клетке ингибиторы HDAC способны вызывать различные антипролиферативные эффекты (апоптоз или старение) в контексте одинакового типа клеток и онкогенной трансформации.

СНИЖЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ STIM1 В КЛЕТКАХ НЕК293 ВЫЗЫВАЕТ ПОДАВЛЕНИЕ РЕЦЕПТОР- И ДЕПОУПРАВЛЯЕМОГО ВХОДА Ca^{2+} . © И. А. Поздняков, В. А. Вигонт, С. В. Львовская, О. А. Зимица. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, neofuturu@mail.ru.

STIM1 — трансмембранный белок, большая часть пула которого локализована в мембране эндоплазматического ретикулума (ЭР) и меньшая — в плазматической мембране клетки. Он имеет один трансмембранный сегмент, длинный С-терминальный участок, обращенный в цитоплазму, а на своем N-терминальном участке, ориентированном в люмен ЭР, — кальций-чувствительный домен EЕ-hand. Данные по структурно-функциональной организации белка STIM1 позволяют предполагать, что он играет роль сенсора концентрации свободного кальция внутри депо и основного посредника в передаче сигнала от опустошенных депо к рецептор- и депоуправляемым каналам плазматической мембраны.

Для вычисления роли белка STIM1 в рецептор- и депоуправляемом входе Ca^{2+} в электроневозбудимые клетки линии НЕК293 была получена стабильная линия клеток со сниженным содержанием этого белка — клон на основе НЕК293, названный НЕКС4. Клон был получен с помощью метода РНК-интерференции. Проверка снижения содержания белка STIM1 в клетках клона по сравнению с контрольными НЕК293 велась методами SDS-электрофореза лизатов соответствующих клеток и последующего иммуноблотинга с моноклональными антителами против STIM1. Содержание STIM1 в клетках НЕКС4 снижено на 70 % по сравнению с контролем.

Для сравнения интегральных токов кальция в клетки с подавленной экспрессией *Stim1* (клон НЕКС4) и в клетки, в которых экспрессия этого гена не подавлялась (контроль), проводили эксперименты с помощью метода локальной фиксации потенциала на мембране в конфигурации «целая клетка».

При сравнении интегральных токов кальция через плазматическую мембрану, развивающихся в ответ на приложение 1 мкМ тапсигаргина, для клеток клона НЕКС4, где экспрессия *Stim1* подавлена, и клеток с нормальным уровнем экспрессии этого гена показано практически полное подавление тока кальция (на 80 % ($P < 0.05$)) в клетки НЕКС4 по сравнению с контролем. Можно сделать вывод о том, что снижение экспрессии *Stim1* ведет к подавлению исключительно депозависимого входа кальция в клетку, так как тапсигаргин пассивно опустошает депо, ингибируя работу кальциевых помп ЭР.

При сравнении интегральных токов кальция через плазматическую мембрану, развивающихся в ответ на приложение 100 мкМ УТР, для клеток клона НЕКС4 и контрольных клеток, в которых экспрессия этого гена не подавлялась, наблюдается практически полное снижение тока кальция (на 95 % ($P < 0.05$)) в клетки клона НЕКС4.

Наличие остаточного тока может быть связано с тем, что в клетках клона НЕКС4 экспрессия *Stim1* подавлена не полностью. Тем не менее из полученных данных можно заключить, что STIM1 необходим для регуляции активности рецептор- и депоуправляемых каналов клеток линии НЕК293, так как УТР — агонист и рецептор-, и депоуправляемого входа Ca^{2+} .

Стоит также отметить, что амплитуды интегральных токов кальция в клетки НЕКС4, вызванные приложением как УТР, так и тапсигаргина, практически не различаются. Это свидетельствует о том, что снижение концентрации STIM1 особенно критично для рецепторуправляемого входа, так как УТР является агентом, активирующим оба типа входа ионов кальция в клетку.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-01107а и 07-04-0224), гранта «Ведущие научные школы» НШ-1135.2008.4 и программы МКБ РАН.

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЯДЕРНОГО БЕЛКА НМГВ1 И СПЕЦИФИКА ЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ДНК. © Т. Ю. Родионова,^{1,2} А. М. Поляничко,^{1,2} Е. В. Чихиржина,¹ В. И. Воробьев.¹ ¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и ² Физический факультет С.-Петербургского государственного университета, tati-rod9@gmail.com.

Негистоновый белок хроматина НМГВ1 (от англ. High Mobility Group) присутствует как в цитоплазме, так и в ядре клетки в значительных количествах (локализация и количество сильно зависят от типа ткани). На сегодняшний день нет четкого представления не только о выполняемых НМГВ1 функциях, но и о механизмах его взаимодействия с ДНК. Большая часть экспериментальных данных указывает на то, что НМГВ-белки связываются избирательно с отдельными участками хроматина; это связывание определяется не последовательностью нуклеотидов, а конформацией данной области ДНК. По этой причине считается, что белок выполняет прежде всего структурную функцию в хроматине. Однако есть основания предполагать, что при взаимодействии с ДНК изменяются и свойства самого белка, что должно находить отражение в изменении его структуры. Методами кругового дихроизма, УФ-спектроскопии, плавления ДНК и гель-ретардации мы проводили изучение структурных изменений в молекулах ДНК и белка в ходе комплексообразования.

Имеющиеся литературные данные по структурной организации белка несколько разнятся. В частности, согласно данным ЯМР отдельных ДНК-связывающих доменов белка, в нативном состоянии доля α -спиральных участков в молекуле НМГВ1 превышает 80 %. В то же время, по данным термодинамических исследований других авторов, белок приобретает ярко выраженную вторичную структуру только при температурах ниже 5 °С, т. е. при физиологических условиях он преимущественно неупорядочен. Методом кругового дихроизма нами было показано, что при 25 °С степень α -спиральности НМГВ1 не превышает 30 %. В ходе взаимодействия с ДНК, являющейся его природной мишенью в хроматине, с ростом содержания белка в пробе вплоть до весового соотношения белок/ДНКг = 0.4 происходит увеличение доли спиральных участков в белке на 15 % по сравнению с белком в

свободном состоянии. При данных весовых соотношениях белок/ДНК значительных спектральных изменений в структуре ДНК еще не наблюдается. Дальнейшее увеличение содержания белка в пробе приводит к сильным межмолекулярным взаимодействиям и образованию надмолекулярных ДНК-белковых комплексов.

Методом гель-ретардации установлено, что HMGB1 при наличии в растворе линейной, релаксированной и суперскрученной форм ДНК избирательно связывается с суперскрученной формой. Анализ спектральных данных и гель-ретардации позволяет заключить, что вне зависимости от форм ДНК в растворе размер участка связывания HMGB1 с ДНК, при котором еще не наблюдается активных белок-белковых взаимодействий в комплексе, составляет 80—100 п. о. В этой области малых значений r проведена проверка термостабильности ДНК в комплексе. Анализировалась температура плавления ДНК при увеличении содержания белка в пробе. Несмотря на особенность взаимодействия HMGB1 с ДНК, проявляющаяся в сильном изгибе двойной спирали в месте связывания, нами было показано, что температура плавления ДНК в комплексе смещается в сторону высоких температур с ростом количества белка в комплексе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-08-01119) и правительства Санкт-Петербурга.

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ПРОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ ГЕНА *IL-6* С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДА HRM. © А. Л. Рунов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, tsinakan@gmail.com.

Значительное число однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), обнаруженных в геноме человека, имеет медицинское значение. Присутствие SNP может оказывать влияние как на экспрессию генов, так и на структуру кодируемых ими белков и позволяет предсказать ответ организма на заболевания, факторы окружающей среды или терапию. Таким образом, несомненный интерес представляют методы, позволяющие не только охарактеризовать известные SNP, но и выявить присутствие ранее не описанных SNP.

В настоящей работе рассматривается применение метода плавления ДНК с высоким разрешением (HRM) для анализа полиморфизма промоторной области гена интерлейкина-6 (*IL-6*) человека.

IL-6 — интерлейкин, который может действовать как провоспалительный и противовоспалительный цитокин. Он является одним из важнейших медиаторов острой фазы воспаления. Уровень его экспрессии является одним из определяющих факторов интенсивности воспалительного ответа и, таким образом, может играть роль в развитии посткардиотомного синдрома (ПКТС) — частого осложнения при хирургических операциях на открытом сердце.

Для проведения исследования препараты ДНК были выделены из образцов периферической крови 200 пациентов Федерального центра сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова Росмедтехнологий. Промоторная область гена *IL-6* была амплифицирована в составе шести перекрывающихся фрагментов размером 89—172 п. о. HRM-анализ выявил присутствие SNP только в одном из исследованных фрагментов. SNP $-174G > C$ был идентифицирован прямым сиквенсом продуктов ПЦР, относя-

щихся к разным аллелям по результатам HRM-анализа. Результаты исследования подтверждают влияние полиморфизма $-174G > C$ гена *IL-6* на развитие ПКТС у людей.

ВХОД КАЛЬЦИЯ В КЛЕТКУ В РЕЗУЛЬТАТЕ ДИССОЦИАЦИИ КОМПЛЕКСОВ АДАПТЕРНЫХ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА НОМЕР В КЛЕТКАХ ЛИНИИ 431 И ЛИНИИ SK-N-SH. © М. А. Рязанцева, А. В. Шальгин. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, mariaandreevna@gmail.com.

Активация сигнального пути, сопряженного с фосфолипазой C, во многих электроневозбудимых и нервных клетках сопровождается выбросом кальция из внутриклеточных депо и последующим его вхождением через каналы в плазматической мембране. Вход кальция в результате опустошения депо осуществляется через так называемые депоуправляемые каналы. Эти каналы обладают низкой проводимостью и высокой селективностью для ионов кальция и бария. Точный механизм активации депоуправляемых каналов на данный момент неизвестен. Одна из гипотез предполагает взаимодействие депоуправляемого канала с рецептором инозитол-1, 4, 5-трисфосфата (IP_3R) в мембране эндоплазматического ретикулума.

В электроневозбудимых и нервных клетках экспрессируются адаптерные белки семейства Номер. Белки семейства Номер образуют олигомеры и создают молекулярные комплексы, связываясь с белками-мишенями, содержащими аминокислотную последовательность PPXXF, где X — любая аминокислота. Таким белком-мишенью для белков Номер является IP_3R . Было показано, что синтетический пептид, содержащий последовательность PPKKFR, нарушает взаимодействие Номер с IP_3R *in vitro*. Было сделано предположение о том, что белки семейства Номер принимают участие в активации депоуправляемого входа кальция в клетках эпидермоидной карциномы человека линии A431 и клетках нейробластомы линии SK-N-SH.

В работе использовался метод локальной фиксации потенциала patch-clamp в конфигурации «Whole-cell». Добавление в раствор регистрирующей пипетки синтетического пептида PPKKFR, вызывало активацию селективных кальциевых каналов в клетках линии A431. По своим характеристикам ток через эти каналы был идентичен току через описанные ранее в клетках A431 депоуправляемые кальциевые каналы. При последующем добавлении во внеклеточный раствор УТФ не происходило изменения тока. Добавление в раствор регистрирующей пипетки контрольного пептида PPKKRR, не распознаваемого белками в качестве лиганда, не вызывало активации входа кальция в клетку, но в этих же экспериментах приложение УТФ вызывало активацию депоуправляемого кальциевого входа. Был сделан вывод о том, что при разобщении связи олигомеров Номер с белками-мишенями происходит активация депоуправляемых каналов в клетках линии A431.

В клетках нейробластомы SK-N-SH в экспериментах с добавлением в регистрирующую пипетку пептида PPKKFR происходила активация входа кальция в клетку через селективные кальциевые каналы, обладающие низкой проводимостью. Последующее опустошение депо с помощью тапсигаргина не вызывало увеличение амплитуды тока. Добавление в раствор регистрирующей пипет-

ки контрольного пептида РРККRR, не распознаваемого белками в качестве лиганда, не вызывало активации входа кальция в клетку, но в этих же экспериментах опустошение депо с помощью тапсигаргина вызывало активацию кальциевого входа с током меньшей амплитуды, чем в экспериментах с пептидом РРККFR. В контрольных экспериментах без добавления пептидов опустошение депо приводило к активации с меньшей амплитудой, чем в экспериментах с добавлением пептида РРККFR. Во всех экспериментах потенциалуправляемые каналы блокировались с помощью нифедипина и тетродотоксина в растворе экспериментальной камеры. Предположительно разобщение связи олигомеров *Notch* с белками-мишенями приводит к активации входа кальция как через депоуправляемые кальциевые каналы, так и через кальциевые каналы, не зависящие от опустошения депо.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-1224) и программы поддержки ведущих научных школ (проект НШ-1135.2008.4).

ДИНАМИКА ПОСТУПЛЕНИЯ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК В КЛЕТКИ HeLa. © А. В. Салова, Т. Н. Беляева, Е. А. Леонтьева, Т. П. Моженок, С. А. Кроленко, Е. С. Корнилова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, avsalova@gmail.com.

Исследование проникновения в клетки различных биологически активных соединений, их внутриклеточного транспорта, локализации и судьбы в клетке получило в последнее время новый мощный стимул при использовании различных наночастиц, в первую очередь квантовых точек (КТ). Работы последних лет не оставляют сомнений в том, что в основе всех этих процессов лежит эндоцитоз. Механизмы этого процесса в различных клетках и при различных условиях исследованы еще недостаточно.

Было изучено взаимодействие КТ—ЭФР с клетками HeLa. Для решения поставленных задач использовали целевые CdSe/ZnS КТ (Invitrogen), конъюгированные со стрептавидином и взаимодействующие с биотинилированным эпидермальным фактором роста (ЭФР), с максимумами эмиссии при длинах волн 655 и 525 нм. Наблюдения проводили на живых клетках с помощью конфокального сканирующего микроскопа Leica TSC SP5.

Показано, что целевые КТ проникают в клетки HeLa. Для проверки специфичности проникновения целевых КТ в клетки HeLa были проведены опыты, в которых клетки инкубировали в среде с КТ в отсутствие биотинилированного ЭФР. В этом случае КТ в клетках не обнаруживались. Приведенные данные свидетельствуют об ЭФР-зависимом поступлении КТ в клетки.

При формировании комплекса КТ—ЭФР на поверхности клеток при 4 °С КТ обнаруживаются только на плазматической мембране. Через 15 мин после стимуляции эндоцитоза (инкубация клеток при 37 °С) КТ выявляются в виде мелких везикул, расположенных внутри клетки вблизи плазматической мембраны. После 30 мин инкубации при 37 °С более крупные везикулярные структуры, содержащие КТ, локализуются по всей цитоплазме. Через 90—150 мин КТ наблюдаются в виде скоплений в околоядерной области. В наших экспериментах КТ не были выявлены в ядрах клеток. По данным литературы, при формировании ЭФР-рецепторных комплексов на поверхно-

сти клеток HeLa при 4 °С с последующим запуском эндоцитоза (инкубация клеток при 37 °С) деградация этих комплексов завершается через 120 мин. По нашим данным, комплексы КТ—ЭФР вносят определенные изменения в динамику этого процесса: они выявляются в клетках по крайней мере в течение 24 ч. Подсчет количества везикулярных структур на этих этапах показал, что после 15—30 мин происходит существенное уменьшение их числа.

Слияние везикулярных структур в процессе эндоцитоза изучали, используя КТ525 (зеленые) и КТ655 (красные). В клетках были обнаружены различные везикулярные структуры, обладающие только красной, только зеленой и одновременно красной и зеленой флуоресценцией. Такая смешанная флуоресценция рассматривается как результат слияния красных и зеленых везикул. Следует отметить, что с увеличением времени инкубации клеток растет число таких везикул. Наблюдаемые изменения флуоресценции везикул являются отражением динамики эндоцитоза и свидетельствуют о разной степени зрелости этих структур.

Проводилось исследование влияния различных соотношений ЭФР и КТ (1 : 1, 4 : 1 и 20 : 1) на проникновение комплексов КТ—ЭФР в клетки HeLa. При равных концентрациях ЭФР и КТ после стимуляции эндоцитоза формируется меньше везикулярных структур, содержащих КТ, чем при увеличении концентрации ЭФР относительно КТ. Эти результаты свидетельствуют о необходимости стадии димеризации рецепторов ЭФР для инициации эндоцитоза.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00817) и программы фундаментальных исследований президиума РАН № 27 «Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов».

ИНАКТИВАЦИЯ КИНАЗЫ GSK3 β УСИЛИВАЕТ АДГЕЗИОННУЮ И ТРАНСКРИПЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ β -КАТЕНИНА В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ МЫШИ. © Г. С. Синева, В. А. Поспелов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, galsin2209@gmail.com.

Киназа GSK3 β регулирует уровень и активность ряда белков, участвующих в процессах метаболизма, пролиферации и дифференцировки. Одной из мишеней этой киназы является белок β -катенин, который служит транскрипционным фактором для Wnt/Tcf-зависимых генов, а также участвует в формировании E-кадгеринопосредованных межклеточных контактов. Было показано, что, ингибируя GSK3 β или активируя Wnt-сигнальный путь, можно поддерживать плюрипотентность эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) или перепрограммировать соматические клетки в ЭСК-подобные, однако роль GSK3 β в ЭСК пока остается противоречивой.

Мы исследовали эффекты ингибитора GSK3 β BIO (6-Bromoindirubin-3-oxime) на ЭСК мыши и заметили, что обработка BIO приводит к формированию этими клетками более компактизованных колоний. Этот эффект сопровождается накоплением β -катенина и усилением его связывания с E-кадгерином. Однако накапливается также пул β -катенина, который не способен связываться с цитоплазматическим доменом E-кадгерина, фосфорилирован

по тирозину и может направляться в ядро для активации транскрипции. Соответственно под действием ВЮ наблюдаются частичное перераспределение β -катенина из примембранных областей в ядра клеток и запуск транскрипции с Tcf/ β -катенинзависимого репортера. Однако при этом не происходит активации Wnt-зависимых генов, регулирующих эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП). Более того, ВЮ препятствует их экспрессии, обычно наблюдающейся после индукции дифференцировки ЭСК мыши с помощью ретиноевой кислоты. В дифференцирующихся в присутствии ингибитора GSK3 β ЭСК дольше сохраняются межклеточные контакты, в которых присутствует β -катенин. ВЮ также снижает скорость прироста популяции ЭСК, что вызвано не апоптотической гибелью клеток, а их накоплением в G₁-фазе клеточного цикла и сопровождается снижением экспрессии гена *c-myc*.

Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что инактивация GSK3 β усиливает как адгезионную, так и транскрипционную функции β -катенина, но не сопровождается активацией экспрессии Tcf/ β -катенинзависимых генов, регулирующих ЭМП.

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ РЕНИН-АНГИОТЕНЗИНОВОЙ И СЕРТОНИНОВОЙ СИСТЕМ В ПОПУЛЯЦИИ ДОЛГОЖИТЕЛЕЙ СЕВЕРО-ЗАПАДА РОССИИ. © Т. Ю. Смирнова,¹ Г. С. Якупова,² А. Г. Захарчук,³ И. М. Спивак.¹ ¹ Институт цитологии РАН, ² Институт мозга человека РАН, Санкт-Петербург, и ³ Городской гериатрический медико-социальный центр Санкт-Петербурга им. Э. С. Пушкиной, tatiana.smirnova@live.ru.

Согласно оценке Всемирной организации здравоохранения, коронарная болезнь сердца и депрессия находятся на первом и втором местах соответственно среди причин нетрудоспособности в развитых странах. Многие люди одновременно страдают от обоих этих заболеваний. В клинической практике в начале XXI века было достоверно показано, что депрессия увеличивает риск сердечно-сосудистых заболеваний, а с другой стороны, пациенты с сердечно-сосудистыми заболеваниями страдают от депрессии гораздо чаще, чем вообще в популяции.

Существует предположение о том, что депрессии и сердечно-сосудистые заболевания могут иметь общую генетическую природу. В подавляющем большинстве случаев в основе обоих заболеваний лежит комплекс из множества генов и их модуляторов. Как и другие мультифакторные и полигенные болезни, они могут быть результатом взаимодействия определенных генетических факторов с окружающей средой.

В последнее время появились работы, выявляющие важную роль ренин-ангиотензиновой и серотониновой систем при развитии душевных заболеваний и патологических психологических состояний. Одним из основных компонентов серотониновой системы является серотониновый рецептор 5HT_{2A}, C102T-полиморфизм которого связывают с различными психическими заболеваниями и поведенческими реакциями. В литературе также накоплено большое количество данных о роли ренин-ангиотензиновой системы и ее основного компонента — ангиотензинпревращающего фермента (ACE — angiotensin-converting enzyme) — в развитии сердечно-сосудистой патологии.

Наше исследование было направлено на выявление возможной ассоциации I/D-полиморфизма гена ACE и

C102T-полиморфизма гена 5HT_{2A} с активным долгожительством. В исследуемую группу, состоящую из 50 человек, вошли пациенты С.-Петербургского городского гериатрического центра им. Э. С. Пушкиной старше 70 лет.

Генетическое обследование включало в себя выделение ДНК из клеток крови по стандартной методике и генотипирование методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в различных модификациях. Для детекции I/D-полиморфизма в гене ACE применен метод ПЦР с использованием трехпраймерной системы. Для выявления C102T-полиморфизма гена 5HT_{2A} серотонинового рецептора применяли ПЦР с последующим ПДФ-анализом. Фрагменты ДНК разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле.

Достоверных различий в частотах аллелей и генотипов гена ACE между долгожителями и лицами молодого возраста не выявлено.

При исследовании распределения частот аллелей и генотипов гена серотонинового рецептора мы также не обнаружили достоверных различий между группой долгожителей и основной популяцией Северо-Западного региона России. При этом, сравнивая данные литературы, мы выявили существенные различия частот аллелей C102T гена 5HT_{2A} серотонинового рецептора в популяции Северо-Запада России и США: 0.397 (A1) и 0.602 (A2) и 0.615 (A1) и 0.385 (A2) соответственно. Столь существенные популяционные различия заслуживают серьезного внимания. Другие гены серотониновой системы могут быть предметом дальнейшего подробного анализа.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-06-00012а) и программы президиума РАН «Биологические науки — медицине».

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА КАК СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ МИОДИСТРОФИИ МЫШЕЙ mdx. © А. В. Соколова, В. М. Михайлов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, avsookova@inbox.ru.

Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) является одной из наиболее распространенных и тяжелых мышечных дистрофий, при которой нарушается синтез белка дистрофина. Широко используемой моделью МДД являются мыши mdx с точечной мутацией в X-хромосоме, приводящей к блокаде синтеза дистрофина. Для поперечнополосатых мышечных волокон (ППМВ) мышей mdx характерны постоянно повторяющиеся циклы дегенерации—регенерации. В настоящее время широко проводятся исследования, направленные на нахождение путей восстановления нормальной структуры и снижения гибели ППМВ мышей mdx. Одним из перспективных направлений является клеточная терапия взрослыми стволовыми клетками, в частности стволовыми клетками костного мозга.

Целью данной работы было исследовать возможность использования внутривенной трансплантации клеток костного мозга (ККМ) мышей дикого типа предварительно облученным рентгеновским излучением мышам mdx для коррекции их мышечной дистрофии. ККМ получали из бедренных и больших берцовых костей трансгенных мышей C57BL/6, экспрессирующих зеленый флуоресцирующий белок (GFP), и трансплантировали мышам mdx,

предварительно облученным рентгеновским излучением в дозе 3 или 5 Гр. После трансплантации у мышей исследовали четырехглавые мышцы бедра, в которых оценивали экспрессию GFP, а также определяли дистрофин-положительных ППМВ, доли погибших ППМВ и ППМВ без центрально расположенных ядер (ЦЯ(-)).

Показано, что через 2 мес после внутривенной трансплантации ККМ мышам mdx, облученным в дозе 5 Гр, клетки, экспрессирующие GFP, присутствовали в различных органах, включая костный мозг и скелетные мышцы, т. е. экспериментальные животные представляли собой радиационных химер, содержащих как собственные клетки, так и клетки GFP-положительных доноров. Кроме того, в мышцах радиационных химер mdx обнаружены ППМВ, экспрессирующие GFP, что говорит об участии трансплантированных клеток в регенерации ППМВ. Однако увеличения доли ППМВ, содержащих дистрофин, не наблюдается, что согласуется с литературными данными о незначительном нарастании доли дистрофин-положительных ППМВ у радиационных химер, полученных путем трансплантации ККМ мышам mdx, облученных летальными дозами ионизирующего излучения. Для усиления участия трансплантированных клеток в дифференцировке ППМВ на радиационных химер mdx дополнительно воздействовали слабыми комбинированными магнитными полями, настроенными на ион-параметрический резонанс Ca^{2+} (Ca^{2+} -КМП). Показано, что у радиационных химер mdx, полученных путем внутривенного введения ККМ дикого типа облученным в дозе 5 Гр мышам mdx и подвергавшимся через 1 мес после трансплантации дополнительно в течение 1 мес воздействию Ca^{2+} -КМП, доля дистрофин-положительных ППМВ составила $15.8 \pm 3.8\%$, что значительно превышает значения, полученные для радиационных химер mdx, находившихся только в постоянном магнитном поле Земли ($1.2 \pm 0.6\%$). При этом доля ЦЯ(-) ППМВ у химер mdx, подвергавшихся воздействию Ca^{2+} -КМП, в 2 раза превышала долю ЦЯ(-) ППМВ у химер mdx, находившихся в постоянном магнитном поле Земли.

У радиационных химер mdx, полученных путем трансплантации ККМ мышам mdx, облученным в дозе 3 Гр, через 2 и 6 мес после трансплантации также наблюдалось присутствие GFP-положительных ППМВ. Обнаружено нарастание доли дистрофин-положительных ППМВ, достигающее к 6 мес после трансплантации $27.6 \pm 6.7\%$, которое сопровождается снижением доли погибших ППМВ с 2.2 ± 0.6 до $0.7 \pm 0.1\%$ и увеличением доли ЦЯ(-) ППМВ с 10.5 ± 1.0 до $22.6 \pm 1.9\%$. Таким образом, ККМ, трансплантированные внутривенно облученным рентгеновским излучением мышам mdx, участвуют в регенерации ППМВ и приводят к усилению дифференцировки ППМВ мышей mdx. И данный подход в дальнейшем может быть использован для лечения мышечной дистрофии мышей mdx.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЛИГАНДСВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ В КАЧЕСТВЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ЭЛЕМЕНТА СОЦИАЛЬНО ЗНАЧИМЫХ БИОСЕНСОРНЫХ СИСТЕМ. © Ольга В. Степаненко, О. В. Поварова, А. В. Фонин, Олеся В. Степаненко. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, sov@mail.cytspb.rssi.ru.

Разработка и создание биосенсоров — одно из наиболее стремительно развивающихся направлений нанобио-

технологий. При конструировании биосенсорных систем перспективным направлением является использование белков в качестве чувствительного элемента. Практически для любого вещества (аналита) можно подобрать или сконструировать соответствующий лигандсвязывающий белок. Одорантсвязывающие белки могут быть использованы для обнаружения ядов, взрывчатых веществ, наркотиков и т. п., глутаминсвязывающий белок — для определения уровня глутамина в клеточных культурах, D-галактоза/D-глюкозасвязывающий белок (GGBP) — для определения уровня глюкозы в крови и т. д. Очевидно, что белок, используемый в биосенсорной системе, должен обладать высоким уровнем стабильности. Некоторые из этих белков, например одорантсвязывающий белок из обонятельного эпителия свиньи rOBP, имеющий структуру типа β -бочонка, по своей природе обладают высокой устойчивостью к действию химических денатурантов и нагреванию. Белки из термофильных организмов являются хорошей альтернативой мезофильным белкам. Например, трегалоза/мальтозасвязывающий белок (TMBP) из *Thermococcus litoralis* может быть использован вместо GGBP. Возможно создание мутантных рекомбинантных форм белков с большей устойчивостью к агрессивным воздействиям окружающей среды. Создание мутантных форм может быть использовано также для оптимизации константы связывания аналита, что необходимо для разработки биосенсоров, обеспечивающих непрерывное слежение за концентрацией аналита в анализируемой среде.

Результатом взаимодействия лигандсвязывающего белка с анализом является существенное изменение пространственной структуры белка, но до сих пор неясно, какой сигнал следует использовать для регистрации этих изменений. К сожалению, характеристики триптофановой флуоресценции GGBP мало изменяются при взаимодействии с глюкозой. Поэтому собственная флуоресценция вряд ли может быть использована для этих целей. Перспективным представляется использование внешнего флуоресцентного красителя. Однако пока неясны ни принцип выбора такого красителя, ни место его желательной локализации на белке. Другой подход связан с посадкой на белок двух флуоресцентных красителей, составляющих донорно-акцепторную пару, и использованием для определения аналита явления ферстеровского безызлучательного переноса энергии возбуждения. Однако при этом необходимо преодолеть существенные методические трудности, чтобы осуществить присоединение к белку в заданных местах двух различных красителей. В качестве донорно-акцепторной пары могут выступать два флуоресцентных белка, образующих белок слияния с лигандсвязывающим белком, либо более оптимальная, на наш взгляд, пара флуоресцентный белок—флуоресцентный краситель. Одним из методов регистрации взаимодействия GGBP с анализом может быть метод, основанный на использовании явления поверхностного плазмонного резонанса.

При разработке биосенсорной системы на глюкозу прежде всего необходимо сделать выбор принципа его организации. Для реализации выбранной модели необходимо решить ряд задач: 1) изучить стабильность сахарсвязывающего белка; 2) оптимизировать при необходимости лигандсвязывающие свойства белка; 3) отработать методики получения и очистки исследуемых белков в количествах, достаточных для проведения необходимых исследований; 4) отработать методики иммобилизации бел-

ковых молекул на диэлектрические и золоченые подложки; 5) разработать методики присоединения к молекулам белка флуоресцентных красителей с заданной локализацией на белке и в том числе методики избирательной пришивки для флуоресцентных красителей.

АНАЛИЗ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ, УЧАСТВУЮЩИХ В ОТВЕТЕ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТОК НА ПОВРЕЖДЕНИЕ ДНК. © *И. И. Суворова, В. А. Поштелов.* Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, irsuorovov@yandex.ru.

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), получаемые из внутривенной клеточной массы бластоциты, обладают плюрипотентностью — уникальной способностью дифференцироваться в любые производные трех зародышевых листков. Также они характеризуются высокой скоростью пролиферации, отражающей особенности регуляции клеточного цикла: короткая фаза G_1 клеточного цикла и отсутствие остановок в контрольных точках клеточного цикла при действии ДНК-повреждающих агентов. Кроме того, известно, что ЭСК гиперчувствительны к действию различных генотоксических факторов и с легкостью подвергаются апоптозу, элиминируя, таким образом, клетки с поврежденным геном из популяции. В настоящее время предполагается, что сигнальные пути, активируемые при повреждении ДНК, в ЭСК могут отличаться от сигнальных путей, реализуемых в соматических клетках.

В качестве объекта исследования были взяты ЭСК человека и мыши. С использованием иммунофлуоресценции ЭСК были исследованы на наличие активацию ключевых белковых компонентов раннего ответа клетки на повреждение ДНК — фосфорилирование киназы ATM (Ser 1981) и гистона H2AX (Ser 139). Кроме того, в ЭСК в норме с помощью метода ДНК-комет и метода окрашивания антителами к бромдезоксисуридину на хроматиновых нитях было показано присутствие неиндуцированных одонитевых разрывов ДНК, маркированных фосфорилированным гистоном H2AX (γ H2AX). Для того чтобы выяснить, распознаются ли такие одонитевые бреши ДНК репарационной системой ЭСК мыши как повреждения, мы использовали антитела к белку RPA34, который имеет высокое сродство связывания с одонитевой ДНК и гиперфосфорилируется при действии генотоксических факторов. Также нами было показано, что в ЭСК мыши и человека не реализуются контрольные точки клеточных циклов G_1/S и G_2/M при действии ДНК-повреждающих факторов. Одной из причин отсутствия блока G_1/S может быть низкий уровень экспрессии белка p21/Waf1, наблюдаемый в ЭСК. Используя ингибиторы ключевых киназ сигнальных путей, активируемых генотоксическими факторами (ATM/ATR, ATM, Chk2 и Chk1/Wee1), мы исследовали жизнеспособность ЭСК методом МТТ и влияние данных ингибиторов на распределение ЭСК по фазам клеточного цикла. Ингибитор Chk2 фактически не снижает жизнеспособности ЭСК мыши, тогда как при отсутствии активностей киназ ATM, ATR и Chk1 наблюдается заметная клеточная гибель в норме и после облучения, причем при совместном ингибировании киназ ATM/ATR этот процесс более выражен.

Таким образом, несмотря на отсутствие функциональных контрольных точек клеточного цикла и на наличие неиндуцированных одонитевых разрывов ДНК, в

ЭСК все же происходит детекция индуцированных повреждений. В результате запускается либо апоптоз, что является предпочтительнее для ЭСК, либо репарационный процесс, для эффективного выполнения которого требуется активность киназ ATM, ATR и Chk1. Так как множественные неиндуцированные одонитевые разрывы не распознаются репарационной системой ЭСК как повреждения, их следует считать характеристикой ранних эмбриональных стадий.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТИОФЛАВИНА Т С АМИЛОИДНЫМИ ФИБРИЛЛАМИ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ИХ СТРУКТУРЫ. © *А. И. Сулацкая.* Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ansul@mail.ru.

Амилоидные фибриллы — особое компактное состояние белка, которому отвечает глубокий минимум свободной энергии, обусловленный межмолекулярными взаимодействиями макромолекул белка, обогащенных β -структурами. Первоначально амилоидные фибриллы были обнаружены во внеклеточных депозитах при таких заболеваниях, как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и др. Исследования последних лет показали, что при определенных условиях и другие белки, никак не связанные с возникновением болезней (а возможно, что и все белки) могут образовывать амилоидоподобные фибриллы. Таким образом, фибриллярное состояние белков, обогащенное β -складчатыми структурами, можно рассматривать как одно из основных состояний белковой молекулы. Поэтому изучение структуры амилоидных фибрилл имеет существенное значение для понимания фундаментальных основ фолдинга и структурной организации белков и практическое значение для медицины.

Из нативного состояния амилоидные фибриллы могут быть получены только после перехода белка в частично или полностью развернутое состояние. На рубеже столетий стали появляться работы, свидетельствующие о том, что многие белки в принципе не могут сформировать в водном окружении жесткую глобулярную структуру, но тем не менее способны выполнять присущие им функции, т. е. являются нативными. Наличие неупорядоченных участков полипептидной цепи позволяет этим белкам взаимодействовать со своими многочисленными партнерами (лигандами, белками, нуклеиновыми кислотами и т. д.) с полной или частичной утратой присущей им неупорядоченности. Для таких белков высока опасность протеолиза или образования агрегированных форм — олигомеров, аморфных агрегатов и амилоидных фибрилл. Поэтому большую часть времени они должны находиться в комплексах со своими партнерами. Возможно, в основе болезней, сопровождающихся образованием амилоидных фибрилл, лежат не образование их внеклеточных депозитов и не токсичность протофибрилл, а нарушения в регуляторной системе клетки.

Для диагностики возникновения амилоидных фибрилл широко используется бензтиазольный краситель тиофлавин Т (ThT). Предлагаемый нами подход определения стехиометрии связывания красителя, основанный на использовании метода равновесного микродиализа, дает возможность получить все величины, необходимые для построения зависимостей Скетчарда и определения на их основе числа мест связывания красителя в пересчете на молекулу белка и констант связывания красителя с фибриллами.

Нелинейный характер зависимостей Скетчарда, полученный нами для связывания ThT с амилоидными фибриллами на основе амилоидогенных белков инсулина и лизоцима, хорошо отвечает модели, предполагающей существование двух мод связывания. Уравнение Скетчарда, написанное в предположении существования двух мод связывания ThT с амилоидными фибриллами, было использовано для определения константы связывания K_{B1} и K_{B2} и числа мест связывания в пересчете на одну молекулу белка n_1 и n_2 .

Использование этого метода позволило определить: число мод связывания с амилоидными фибриллами, число мест связывания красителя с амилоидными фибриллами для каждой из мод связывания в пересчете на молекулу белка, константы связывания красителя с фибриллами для каждой из мод связывания, спектр поглощения красителя, инкорпорированного в амилоидные фибриллы. Таким образом, метод равновесного микродиализа может оказаться весьма полезным средством для изучения структуры фибрилл и механизмов их образования.

DL1-ПОВТОР В ГЕНОМЕ *DIPHYLLOBOTHRIUM LATUM*. © Н. М. Усманова, В. И. Казаков. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, nmusmanov@gmail.com.

Около 20 млн людей в мире страдают дифиллоботриозом — заболеванием, вызываемым кишечным паразитом лентецом широким (*Diphyllobothrium latum*). Несмотря на важное клиническое значение этого плоского червя, к настоящему времени секвенирован только его митохондриальный геном. Ни один фрагмент ядерной ДНК секвенирован не был. В этой работе впервые установлено наличие повторяющихся элементов в геноме *D. latum*. Мы выделили геномную ДНК из нескольких незрелых проглоттид особи, полученной в результате ее изгнания из кишечника пациента, страдающего дифиллоботриозом. Затем ДНК была обработана эндонуклеазой рестрикции *Pst*I. Продукты рестрикции были разделены при помощи электрофореза в 1%-ном агарозном геле. Продукт рестрикции длиной около 150 н. п., который на электрофореграмме выглядел как размытый бэнд, был субклонирован в плазмиду pUC18 и секвенирован. По нуклеотидной последовательности этого продукта мы выбрали праймеры для его амплификации и провели полимеразную цепную реакцию (ПЦР), используя геномную ДНК *D. latum* в качестве матрицы. В результате ПЦР образовалось несколько мажорных продуктов, которые были субклонированы в плазмиду и секвенированы. Последовательность самого длинного продукта была размещена в базе данных GenBank (номер GQ398237). Оказалось, что этот продукт состоял из 4.5 повтора одной и той же нуклеотидной последовательности. Мы предположили, что в геноме *D. latum* имеется некий повтор и что несколько его копий кластеризовано. Этот повтор был назван нами DL1. Чтобы установить точные начало и конец этого повтора в последовательности GQ398237, мы провели еще одну ПЦР с использованием только одного из ранее выбранных праймеров. Таким образом, мы надеялись амплифицировать сходящиеся инвертированные DL1-повторы. В результате этой реакции образовался всего один мажорный продукт, который был в дальнейшем секвенирован. Последовательность этого продукта была размещена в базе данных GenBank (номер GU350458). При помощи выравнивания с секвенированными ранее последовательностями уда-

лось установить начало и конец DL1-повтора. Несколько признаков указывает на то, что DL1-повтор может относиться к семейству SINE-ретропозонов. Его длина (143—145 н. п.) соответствует средней длине SINE-повторов. Концы сателлита DL1 фланкированы короткими (8 н. п.) прямыми повторами. Компьютерный анализ показал, что в последовательности DL1 имеются множественные А- и В-боксы — элементы расщепленного внутреннего промотора для РНК-полимеразы III. Большинство SINE-ретропозонов имеет такой промотор. Последовательность GU350458 состоит из двух участков: DL1-повтора и неизвестного участка длиной около 400 н. п. Проанализировав этот участок при помощи программы BLASTX, мы обнаружили, что транслированная версия его фрагмента на 40—46 % гомологична фрагментам аминокислотной последовательности обратных транскриптаз таких видов животных, как *Xenopus laevis*, *Schistosoma mansoni*, *Strongylocentrotus purpuratus*, *Hydra magnipapillata* и *Nasonia vitripennis*. Известно, что одной из стадий амплификации ретропозонов является обратная транскрипция, катализируемая обратной транскриптазой. Возможно, последовательность GU350458 представляет собой фрагмент гена обратной транскриптазы *D. latum*, в одном из интронов которого лежит DL1-повтор.

Авторы благодарят А. Ю. Малинина за помощь в секвенировании ДНК.

РЕГУЛИРУЕМЫЕ ЭНДОРИБОНУКЛЕАЗНЫЕ АКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНЫХ АЛЬФА-СУБЪЕДИНИЦ ПРОТЕАСОМ. © О. А. Федорова,¹ А. Г. Миттенберг,¹ Н. А. Барлев.^{1,2} ¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и ² Университет Лестера, Великобритания, fedorova-olgand@mail.ru.

Протеасомы являются мультикаталитическими протеазными комплексами, которые встречаются в ядре и в цитоплазме большинства организмов. Первоначально была выделена 20S-коровая частица, которая, как было показано позднее, входит в состав еще более сложного комплекса 26S-протеасомы. 26S-коровый комплекс представляет собой полный цилиндр, образованный четырьмя кольцами. Протеолитические центры протеасом расположены на бета-субъединицах, которые образуют внутренние кольца. Внешние кольца образованы субъединицами альфа-типа, функции которых заключаются в регуляции доступа субстрата в протеолитическую камеру и во взаимодействии с регуляторными комплексами, входящими в состав протеасомы помимо 20S-коровой частицы. Недавние исследования показали наличие у 20S-протеасомы эндорибонуклеазной активности. Были идентифицированы две субъединицы альфа-типа — $\alpha 1$ и $\alpha 5$, обладающие способностью к расщеплению РНК.

Целью настоящей работы является идентификация субъединиц альфа-типа, обладающих РНКазной активностью, и изучение зависимостей этой функции от присутствия в реакционной смеси ионов Ca^{2+} или Mg^{2+} .

Для идентификации альфа-субъединиц, обладающих способностью к расщеплению РНК, последовательности кДНК субъединиц $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ и $\alpha 7$ были клонированы в экспрессионный вектор pGEX. Были подобраны оптимальные условия экспрессии в *E. coli* химерных белков альфа-типа, слитых с GST. В качестве субстрата РНКазной активности белков были использованы меченные

[³²P] мРНК генов человека *p53* и *c-myc*. Продукты нуклеолиза анализировали с помощью денатурирующего электрофореза высокого разрешения. В качестве отрицательного контроля использовали функционально активную GST, выделенную в соответствии с тем же протоколом, что и химерные белки.

Было показано, что субъединицы $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ и $\alpha 7$, несмотря на отсутствие посттрансляционных модификаций, проявляют эндорибонуклеазную активность по отношению к мРНК *p53* и *c-myc*, и для проявления их активности необходимы ионы Mg^{2+} или Ca^{2+} . При этом мРНК *c-myc* подвергалась расщеплению в большей степени. Субъединица $\alpha 3$ не проявила эндорибонуклеазной активности по отношению к мРНК *p53* и проявила сравнительно небольшую эндорибонуклеазную активность по отношению к мРНК *c-myc*.

Таким образом, есть основания полагать, что кроме ранее известных субъединиц $\alpha 1$ и $\alpha 5$ существуют еще три субъединицы — $\alpha 2$, $\alpha 4$ и $\alpha 7$, которые обладают РНКазной активностью. Данная активность регулируется присутствием в реакционной смеси двухвалентных катионов — Ca^{2+} и Mg^{2+} .

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00834) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

ВОЗМОЖНОЕ УЧАСТИЕ НИКОТИНАМИДАДЕНИНДИНУКЛЕОТИДА (НАД) В РЕПАРАЦИИ ДНК.
© Д. В. Фирсанов, В. М. Михайлов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, alexdelfigo@mail.ru.

Среди различных повреждений ДНК наиболее опасными считаются двухнитевые разрывы (ДР) ДНК, так как они могут приводить к гибели клеток и возникновению опухолей. При возникновении повреждений ДНК происходят активация полимеразы поли-АДФ-рибозы (PARP) и рибозилирование белков хроматина в месте повреждения ДНК при участии НАД. Существует предположение о том, что в клетках во время репарации ДНК после рентгеновского облучения (Р-облучения) происходит конкуренция за внутриклеточный НАД, который интенсивно используется PARP для рибозилирования белков хроматина в сайте повреждения ДНК. Кроме того, повышенная активность PARP репрессирует генную экспрессию и повышает угрозу клеточной гибели. По-видимому, это связано с тем, что повышенный расход НАД приводит к деактивации других НАД-зависимых путей жизнедеятельности клетки. Одним из ранних ответов клеток на возникновение ДР ДНК является фосфорилирование 139-серина гистона H2AX с образованием фокусов гамма-H2AX в местах ДР. Динамика образования и элиминации фокусов гамма-H2AX коррелирует с динамикой репарации ДР ДНК.

В нашей работе мы исследовали влияние экзогенного НАД на динамику образования и накопление гамма-H2AX как маркера ДР ДНК в клетках миокарда и кардиомиоцитах мышей C57BL после Р-облучения. Известно, что кардиомиоциты являются терминально дифференцированными клетками и не пролиферируют. На данный момент существует мало данных о регуляции гибели кардиомиоцитов и динамике их обновления после ДНК-повреждающих воздействий. При помощи иммуно-

морфологического метода нами были получены данные о том, что экзогенный НАД в зависимости от дозы и от времени введения в организм мышей изменяет уровень накопления гамма-H2AX в клетках миокарда. При введении НАД через 5 мин после Р-облучения мышей в дозе 3 Гр через 20 мин мы наблюдали в миокарде существенное увеличение гамма-H2AX-положительных ядер по сравнению с Р-облученными в той же дозе контрольными животными. Через 1 ч после облучения наблюдалось быстрое снижение этого уровня фосфорилирования H2AX до величин ниже уровня облученного контроля. При инъекции НАД за 5 мин до Р-облучения мы не наблюдали значительных изменений накопления гамма-H2AX через 20 и 60 мин после воздействия. Наши данные свидетельствуют о том, что введение экзогенного НАД существенно изменяет уровень фосфорилирования гистона H2AX после Р-облучения и, возможно, влияет на скорость репарации ДР ДНК. Полученные данные являются основанием для более углубленного анализа участия НАД и активности PARP в регуляции фосфорилирования гистона H2AX и регуляции репарации ДР ДНК.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЖДУ НЕГИСТОНОВЫМ БЕЛКОМ ХРОМАТИНА HMGB1 И ЛИНКЕРНЫМИ ГИСТОНАМИ Н1. © А. В. Фони́н, Ольга В. Степаненко. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, alexfonin@gmail.com.

Широко известно, что многие белки могут формировать компактную упорядоченную структуру только в комплексе со своими партнерами — молекулами ДНК или РНК, различными белками, ионами металлов и т. д. Такие белки часто называют нативно неупорядоченными белками. Основная функция белков этого класса состоит в образовании комплексов со своими партнерами и проведении различных внутриклеточных сигналов. Негистоновый белок хроматина HMGB1 и линкерный гистон H1 принадлежат к этому классу белков. Как HMGB1, так и гистон H1 являются основными белками хроматина, принимающими участие в формировании высших уровней его структурной организации. Не исключено, что, будучи компонентом хроматина, HMGB1 и H1 могут взаимодействовать не только с ДНК, но и друг с другом. Работ, посвященных этой проблеме, немного, и они противоречивы.

В данной работе было проведено исследование взаимодействия между HMGB1 и H1 в растворах с различной ионной силой с использованием методов спектрофотометрии, собственной УФ-флуоресценции и КД в дальней и ближней УФ-областях спектра. Молярное соотношение между белками H1 и HMGB1 изменяли от 1 : 4 до 4 : 1.

Обнаруженное уменьшение светорассеяния в растворах HMGB1 при увеличении ионной силы, по-видимому, обусловлено разрушением ассоциатов HMGB1, образованных белком в растворах с низкой ионной силой. Это свидетельствует о том, что образование ассоциатов HMGB1 определяется взаимодействиями, имеющими электростатическую природу. Увеличение содержания H1 в исследуемых растворах также приводит к значительному снижению светорассеяния, что может быть объяснено разрушением ассоциатов HMGB1 при образовании комплексов между белком H1 и HMGB1. Существенное уменьшение светорассеяния в растворах HMGB1 в присутствии H1 в растворах с низкой ионной силой может

быть обусловлено тем обстоятельством, что при самоассоциации MGB1 могут образовываться комплексы, размер которых превышает размер комплекса HMGB1 и гистона H1. Это можно объяснить наличием большего числа мест связывания на поверхности HMGB1 по сравнению с H1, а также большими размерами молекул HMGB1 по сравнению с H1.

Характер изменений в спектрах КД в дальней УФ-области позволил заключить, что при повышении содержания H1 в растворах HMGB1 происходит увеличение доли α -спиральных участков в структуре этих белков. Это свидетельствует о том, что взаимодействие HMGB1 и гистона H1 приводит к увеличению структурированности белков, что также характерно для комплексообразования неупорядоченных белков. С помощью метода собственной УФ-флуоресценции было показано, что третичная структура негистонового белка хроматина HMGB1 в присутствии линкерного гистона H1 изменяется незначительно. При этом наблюдается небольшое тушение триптофановой флуоресценции HMGB1 во всех растворах, содержащих оба белка.

Полученные данные позволили нам заключить, что негистоновый белок хроматина HMGB1 и линкерный гистон H1 способны к взаимодействию между собой. Белок-белковые взаимодействия сопровождаются увеличением доли упорядоченных участков в белковой структуре и небольшими изменениями третичной структуры белков.

СОДЕРЖАНИЕ АЛЬФА-АКТИНИНА-4 В ЯДЕРНЫХ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСАХ P65 СУБЪЕДИНИЦЫ NF- κ B КОРРЕЛИРУЕТ С АКТИВНОСТЬЮ ЭТОГО ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА. © М. Г. Хотин, Л. В. Туроверова, А. В. Соловьева, Г. П. Пинаев, Д. Г. Гентлер. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, h_mg@mail.ru.

Актиновый цитоскелет принимает участие в регуляции многих клеточных процессов, в том числе и экспрессии генов. Активация транскрипционных факторов связан с перестройками цитоскелета. Однако непонятны механизмы участия актинсвязывающих белков в регуляции активности транскрипционных факторов. Показано, что субъединица p65 транскрипционного фактора NF- κ B связана в цитоплазме с актинсвязывающим белком альфа-актинином-4. При разборке цитоскелета p65 перемещается в ядро, где также остается связанной с альфа-актинином-4.

Для проверки гипотезы об участии альфа-актина-4 в регуляции активности p65 нами проведен корреляционный анализ между активностью p65 и содержанием альфа-актина-4 в комплексе с p65 в ядрах клеток A431. Активность p65 оценивали по уровню экспрессии 9 генов-мишеней p65. Были выбраны гены, продукты которых участвуют в различных клеточных процессах. Известно, что структура цитоскелета различна у клеток, распластанных на различных белках внеклеточного матрикса. Поэтому для исследования участия альфа-актина-4 в регуляции активности p65 клетки линии A431 культивировали на пластике, фибронектине, ламинине 2/4, коллагенах 1 и 4. Анализ экспрессии генов проводили методом ОТ-ПЦР. Методом иммуноблоттинга анализировали состав ядерных белковых комплексов, полученных иммунопреципитацией с антителами против p65. Анализ

электрофореграмм и иммуноблоттинга проводили при помощи программы QuantityOne.

Обнаружено, что содержание как p65, так и альфа-актина-4 в ядрах клеток A431 зависит от того белка внеклеточного матрикса, на котором они культивировались. Не весь ядерный альфа-актина-4 связан с p65, что свидетельствует об участии этого актинсвязывающего белка в других ядерных комплексах. Обнаружена корреляционная связь ($P < 0.05$) между содержанием альфа-актина-4 в комплексе p65 и активностью двух генов-мишеней p65. Для гена TNC эта зависимость была прямой, а для гена VAX обратной. Эти данные свидетельствуют о возможном участии альфа-актина-4 в регуляции активности транскрипционного фактора NF- κ B в отношении некоторых генов. Дополнительно подтверждаются предварительные данные об участии этого актинсвязывающего белка в различных клеточных процессах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-011-90-а).

РЕГУЛИРОВАНИЕ ДЕПОУПРАВЛЯЕМЫХ КАНАЛОВ КЛЕТОК A431 АДАПТЕРНЫМИ БЕЛКАМИ НОМЕР. © А. В. Шалыгин, М. А. Рязанцева, Е. В. Казначеева. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, a_shalygin@mail.ru.

В электронезбудимых клетках основной путь входа Ca^{2+} из внеклеточной среды — депоуправляемые каналы. Депоуправляемые каналы активируются опустошением внутриклеточных Ca^{2+} депо. В недавних работах было показано, что адаптерные белки семейства Номег могут регулировать активность депоуправляемых каналов, и было высказано предположение о том, что белки Номег могут колокализовать белки, регулирующие депоуправляемые каналы. Расположенный на N-конце белков семейства Номег домен EVH1 распознает последовательность пролин—пролин—две любые аминокислоты—фенилаланин—аргинин (PPXXFR) у белков мишеней. Изоформы белка Номег 1c (H1c) могут связывать белки-мишени в единый макромолекулярный комплекс, поскольку они способны образовывать гомоолигомерные комплексы, в то время как у изоформы Номег 1a (H1a) на C-конце отсутствует домен coil-coiled, поэтому она не способна олигомеризоваться и, таким образом, является негативным регулятором белков H1c.

Нами было установлено, что в клетках линии A431 экспрессируются рецепторы инозитол-1, 4, 5-трифосфата первого типа (InsP₃R1) и белки H1c. Используя метод локальной фиксации потенциала в конфигурации whole-cell, мы установили, что пептид PPKKFR (приводящий к диссоциации белков Номег от своих мишеней) вызывает активность депоуправляемых каналов. Контрольный пептид PPKKFR, не распознаваемый доменом EVH1 белков Номег, не имел эффекта. Опыты в inside-out конфигурации выявили, что только депоуправляемые каналы Imin клеток A431 активируются пептидом PPKKFR. Белок H1c не активировал Imin-каналы в отличие от белка H1a. Добавление инозитол-1, 4, 5-трифосфата (InsP₃) к каналам, активированным H1a или PPKKFR, не приводило к дальнейшему увеличению активности этих каналов.

Антитела к белку H1c коиммунопреципитировали InsP₃R1 из лизатов клеток A431. Это взаимодействие от-

менялось преинкубацией клеток со 100 мкМ УТФ или добавлением 100 нМ РРККFR к лизату. И наоборот, белок Stim2 (кальциевый сенсор эндоплазматического ретикулума) мог быть иммунопреципитирован только из клеток, обработанных УТФ (пептид РРККFR, добавленный в предобработанный лизат, разрушал такое взаимодействие). Результаты экспериментов pull down показали, что белки H1c и H1a специфически взаимодействуют с InsP₃R1. Добавление InsP₃ к этому комплексу приводило к диссоциации белков Homer от InsP₃R1.

На основании полученных нами данных можно заключить, что белки семейства Homer регулируют депоуправляемые каналы клеток A431. Причем влияние белков Homer различаются для разных типов депоуправляемых каналов клеток A431. Только каналы Imin активировались в ответ на диссоциацию белков Homer. Возможно, олигомерные комплексы белков Homer блокируют актив-

ность каналов, а разобщение взаимодействия олигомерных комплексов белков Homer и их мишеней приводит к активации депоуправляемых каналов Imin. В физиологических условиях такое разобщение может осуществляться за счет действия УТФ при увеличении концентрации InsP₃ в цитоплазме или при увеличении концентрации белка H1a. Известно, что Stim2 ингибирует депоуправляемые каналы, а InsP₃R1, напротив, необходим для активации Imin. Можно предположить, что связывание белков Stim2 олигомерными комплексами H1c приводит одновременно как к снижению блокирующего эффекта Homer, так и к уменьшению ингибирующего эффекта Stim2, что и вызывает развитие кальциевого тока. Результаты этой работы показывают, что белки Homer могут не только непосредственно влиять на депоуправляемые каналы, но и участвовать в передаче сигнала об опустошении депо каналов плазматической мембраны.