

**ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ И СООБЩЕНИЙ,
ПРЕДСТАВЛЕННЫХ НА I ВСЕРОССИЙСКУЮ КОНФЕРЕНЦИЮ
«ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ, ТРАНСПОРТ, ЦИТОСКЕЛЕТ»
(Санкт-Петербург, 11—13 октября 2011 г.)**

ФОРМИРОВАНИЕ ИНИЦИАЛЬНЫХ ФОКАЛЬНЫХ АДГЕЗИЙ ПРИ ДВИЖЕНИИ КЛЕТОК И ИХ РОЛЬ В РЕОРГАНИЗАЦИИ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА.
© А. Ю. Александрова. НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва.

Фокальные адгезии (ФА) — сложно организованные структуры, в состав которых, по последним данным, входит около 70 белков. ФА выполняют не только функцию прикрепления клетки к субстрату, но и многочисленные регуляторные функции. В зависимости от размера и стадии формирования ФА выделяют незрелые фокальные комплексы (мелкие точечные адгезии) и зрелые фокальные контакты (ФК) (удлиненные структуры, связанные с актиновыми пучками). Довольно хорошо исследовано строение зрелых ФК на уровне световой и электронной микроскопии и показана динамика их созревания. Однако мало известно о процессах инициации и начале формирования ФА, практически ничего не известно о строении этих структур на ранних стадиях формирования и о взаимодействии инициальных ФА с актиновым цитоскелетом. Мы исследовали динамику образования первичных ФА с помощью видеомикроскопии, снимая живые клетки, трансфицированные различными белками фокальных контактов, меченными флуоресцентными красителями. Для исследования строения первичных ФА мы проводили коррелятивную электронную и видеомикроскопию, фиксируя клетки после видеосъемки прямо под микроскопом, чтобы проанализировать ФА с известной историей с помощью электронной томографии. В качестве маркеров ФА использовали VASP, винкулин, зиксин и бета-3-интегрин (как маркер связывания ФА с субстратом). Мы показали, что первичные ФА образуются в зоне ламеллиподии на ведущем краю движущейся клетки. После формирования ФА граница ламеллиподии — ламелла сдвигается в эту точку, т. е. образование первичных ФА определяет положение границы между ламеллиподией и ламеллой. Первым белком адгезии, появляющимся в ламеллиподии в месте формирования ФА, является VASP, а через несколько секунд в эту точку приходят и другие белки. При этом VASP, винкулин и бета-3-интегрин не вымываются из инициальных ФА после экстракции клетки, т. е. оказываются включенными в структуры, а зиксин при экстракции удаляется из инициальных ФА и закрепляется в них только после локальных сокращений клеточного края. Таким образом, VASP, вероятно, выполняет функцию «организатора» при формировании ФА. Мы исследовали структуру формирующихся ФА с помощью то-

мограммы на электронном микроскопе и построили 3-мерную модель ФА на разных стадиях формирования. Показано, что формирование инициальных ФА в зоне ламеллиподии происходит без видимых изменений актинового цитоскелета. Дальнейшее созревание ФА в ФК и перестройка актиновой сети осуществляются всегда на основе инициального ФА, некоторые инициальные ФА растворяются. На электронно-микроскопическом уровне ФК, обнаруживаемые на границе ламеллиподии — ламеллы, имеют четко выраженную структуру, представлены короткими плотными пучками микрофиламентов и связаны с мелкими пучками, идущими к центральной части клетки. На месте зрелого ФК, расположенного на ведущем краю клетки, микрофиламенты образуют густую подмембранную сеть, а в нижней части актиновые филаменты объединены в пучок, идущий в центральную часть клетки. При этом есть большой пул актиновых филаментов, переходящих с верхней поверхности в состав пучка.

Таким образом, мы показали существование предварительной стадии формирования ФА, более ранней, чем классические ФК, выяснили их структуру, построили 3-мерные модели ФА на разных стадиях формирования и предложили схему участия ФА в реорганизации актиновой сети при движении клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 08-04-00452-а и 11-04-01473-а).

ФИБУЛИН-5 ОПОСРЕДУЕТ СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ УРОКИНАЗЫ НА МИГРАЦИЮ ФИБРОБЛАСТОВ.
© Н. В. Аниол, А. В. Воротников. Медицинский факультет МГУ им. М. В. Ломоносова.

Активатор плазминогена урокиназного типа (урокиназа) стимулирует миграцию клеток как за счет активации протеолиза внеклеточного матрикса, так и запуская внутриклеточную сигнализацию. Однако рецептор урокиназы является GPI-закоренным белком, лишенным трансмембранного и внутриклеточного доменов, и не может проводить сигнал внутрь клетки. Считается, что он активирует миграцию опосредованно через другие трансмембранные рецепторы, такие как интегрины и (или) тирозинкиназные рецепторы.

Фибулин-5 (FB5) — это белок внеклеточного матрикса, который взаимодействует с интегриновыми рецепто-

рами и участвует в организации эластиновых волокон. В нашей лаборатории было показано, что урокиназа взаимодействует с С-концевым доменом FB5. Мы предположили, что урокиназа стимулирует миграцию клеток опосредованно через FB5. Для проверки этой гипотезы мы использовали линейные эмбриональные фибробласты, полученные из мышей дикого типа (MEF FB5^{+/+}) и нокаутированных по гену FB5 (MEF FB5^{-/-}).

Мы обнаружили, что урокиназа стимулирует миграцию клеток MEF FB5^{+/+} через мембрану Transwell, покрытую коллагеном I типа, но не влияет на хемотаксис клеток MEF FB5^{-/-}. Поскольку миграция клеток через мембрану складывается из их адгезии и последующего направленного движения, мы отдельно исследовали влияние урокиназы на адгезию и миграцию MEF. Мы выяснили, что урокиназа не изменяет адгезию клеток обеих исследуемых линий. В то же время урокиназа ускоряет движение клеток MEF FB5^{+/+} в свободную зону экспериментальной раны монослоя, но не влияет на движение клеток MEF FB5^{-/-}. Таким образом, FB5 участвует в регуляции миграции клеток под действием урокиназы.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДВИЖЕНИЯ ХРОМОСОМ В МИТОЗЕ. © Ф. И. Атауллаханов. Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, Физический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова и Гематологический научный центр РАМН, Москва.

В последние 5—6 лет был в значительной степени выяснен механизм работы нанодвигателя, обеспечивающего движение хромосомы при делении клетки. Оказалось, что хромосомы двигает машина, механизм работы которой уникален и не имеет аналогов ни в биологии, ни в технике, ни в других областях науки. Главными движителями хромосом являются микротрубочки. Эти трубки, имеющие диаметр в 25 нм и состоящие из одного белка — тубулина, могут запасать химическую энергию в виде механического напряжения, которое потом используется для движения хромосомы. Проведенное нами исследование динамики деполимеризации такой трубки с помощью лазерного динамометра показало, что могут развиваться довольно большие по молекулярным меркам силы — до 70—80 пиконьютонов (Molodtsov M., Ataullakhanov F. et al., PNAS, 2005; Grishchuk E., Ataullakhanov F. et al., Nature, 2005; Efremov A., Ataullakhanov F. et al., PNAS, 2007; McIntosh R., Ataullakhanov F. et al., Cell, 2008). Эти силы микротрубочка развивает в ходе процесса, называемого «катастрофой»: стенки микротрубочки растрескиваются вдоль ее оси, и образующиеся длинные узкие «протофиламенты» изгибаются наружу и толкают специальный комплекс белков, связанных с хромосомой. Кинетохорный комплекс белков, обеспечивающих динамическое сопряжение движения хромосомы с разбирающимся концом микротрубочки, формирует сложное устройство, структуру и работу которого мы только начинаем понимать. Возможные гипотезы об устройстве этого комплекса будут проанализированы и сопоставлены с экспериментальными данными.

КАПСУЛА КАРИОСФЕРЫ ЛАБОРАТОРНОГО НАСЕКОМОГО *TRIBOLIUM CASTANEUM* КАК КОМПОНЕНТ ЯДЕРНОГО МАТРИКСА ООЦИТОВ © Ф. М. Баталова,

А. М. Киселев, И. С. Степанова, Д. С. Боголюбов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, dmitr@mail.cytspb.rssi.ru.

В оогенезе многих животных формируется кариосфера (кариосома) — комплексное образование, объединяющее в ограниченном объеме ядра весь хромосомный набор ооцита. Ее формирование обычно отражает инактивацию хромосом к концу периода роста яйцеклетки. У некоторых организмов конденсированные хромосомы в составе кариосферы окружены сложно устроенной капсулой, которая является частью ядерного матрикса и обеспечивает дополнительный уровень компартиментализации ядра ооцита. Объект данного исследования — булавосый мучной хрущак *Tribolium castaneum* — в настоящее время стал новым лабораторным видом насекомых благодаря успешно завершённой программе по секвенированию его генома. Однако морфологические и функциональные особенности ядерных структур ооцитов *T. castaneum* как модельного объекта различных биологических дисциплин остаются неизученными. В наших исследованиях мы установили, что на стадии диплотены мейоза хромосомы ооцита *T. castaneum* довольно рано конденсируются, объединяясь в компактную кариосферу. Этот процесс сопровождается формированием вокруг конденсированного хроматина обширной фиброзной капсулы, которая состоит из нескольких морфологических элементов. Существенным молекулярным компонентом капсулы кариосферы *T. castaneum* являются белки ядерного матрикса, в том числе фибриллярный актин, а также ламин В и ДНК-топоизомераза II. Интересно, что ламин В и ДНК-топоизомераза II обнаруживаются не только в составе волокнистого материала капсулы, но и в составе ассоциированных с ним многочисленных экстрахромосомных телец (доменов). В ходе роста ооцита ядерное распределение ламина В обнаруживает выраженный динамизм: от низкого содержания в ядре и диффузного распределения до концентрации в составе ядерных доменов, в том числе в связи с капсулой кариосферы. Принято считать, что функция капсулы кариосферы состоит в изоляции конденсированного хроматина от остальной части нуклеоплазмы в течение продолжительной по времени стадии диплотены, а также в механическом удержании хромосом в ограниченном участке крупного ядра ооцита. Однако очевидно, что это не единственная ее функция. В ходе наших исследований мы неожиданно обнаружили, что материал капсулы в значительной степени обогащен симметричными диметиларгининами (sDMA) — компонентами аргинин-глициновых (RG) повторов, характерных для Sm-эпитопа коровьих белков (Sm-белков) малых ядерных рибонуклеопротеиновых частиц (мяРНП) U1, U2, U4/U6 и U5, которые являются ведущими факторами сплайсинга пре-мРНК. Кроме того, в составе капсулы выявлен триметилгуанозинный кэп, характеризующий 5'-конец U1, U2, U4 и U5 мяРНК сплайсинга, которые завершили цитоплазматическую фазу своего процессинга. Вместе с тем важным сплайсосомным компонентом SR-белок SC35 локализуется не в капсуле кариосферы, а в составе многочисленных телец, как связанных с кариосферой, так и лежащих свободно в нуклеоплазме. Накопление данного белка в этих тельцах служит одним из основных критериев, позволяющих считать их кластерами интерхроматинных гранул (ядерными «speckles»). По нашим представлениям, капсула кариосферы представляет собой специализированную часть ядерного матрикса ооцитов, которая вы-

полняет не только структурную роль, но может, по-видимому, участвовать в интеграции различных ядерных процессов, связанных в том числе с метаболизмом РНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 11-04-01258 и 09-04-00723) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

АССОЦИАЦИЯ АКТИНА И ФАКТОРОВ ЭКСПОРТА мРНК В ЯДРАХ РАННИХ ЭМБРИОНОВ МЫШИ.
© И. О. Боголюбова, В. Н. Парфенов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ibogol@mail.ru.

Ядерный актин является ведущим компонентом нуклеоскелета эукариотической клетки, где, по современным представлениям, выполняет не только структурную функцию, но и вовлечен в различные ядерные процессы, включая транскрипцию, ремоделинг хроматина и создание особого микроокружения активных генов (local euchromatin neighborhoods). Предполагают, что актин также принимает участие в транспорте и экспорте мРНК. В данной работе с помощью непрямого двойного иммунофлуоресцентного мечения с последующей конфокальной микроскопией был проведен анализ динамики солокализации внутриядерного актина и некоторых компонентов процесса экспорта мРНК (белков Aly, Y14 и NXF1/TAP) на ранних стадиях эмбриогенеза мыши, различающихся по транскрипционной активности ядер. Солокализация выявляемых антигенов практически не выражена в ядрах ранних эмбрионов, на стадиях, характеризующихся низкой транскрипционной активностью ядер (до завершения процессов активации эмбрионального генома), и начинается вывляться на транскрипционно активной поздней двухклеточной стадии дробления. При этом зоны, меченные и теми и другими антителами, можно условно разделить на две группы: а) зоны нуклеоплазмы с нечетко определенными границами, устойчивые к обработке ДНКазой, наблюдаемые при выявлении С-концевого домена молекулы актина совместно с белками Aly, NXF1 и Y14; б) более четко оформленные округлые области, ассоциированные с периферией проядрышек, устойчивые к обработке РНКазой, которые наблюдали при выявлении С-концевого домена актина совместно с белками NXF1 и Y14. Дополнительные эксперименты, сочетающие одновременное выявление Y14 и С-концевого домена актина и искусственное подавление транскрипционной активности, продемонстрировали значительное увеличение количества и размеров зон солокализации данных антигенов, ассоциированных с периферией проядрышек. Полученные данные позволяют заключить, что исследованные нами факторы экспорта мРНК (Aly, NXF1 и Y14) в транскрипционно активных ядрах эмбрионов ассоциированы с олигомерным актином, выявляемым с помощью антител к С-концевому участку молекулы. Изменение паттерна солокализации в зависимости от транскрипционной активности ядер эмбрионов позволяет предположить, что по крайней мере часть молекул актина, ассоциированных с факторами экспорта мРНК, входит в состав сложных молекулярных ансамблей, которые взаимодействуют с новосинтезированной мРНК и обеспечивают ее экспорт. Таким образом, представленные нами данные могут служить одним из доказательств непосредственного участия ядерного актина в координации экспорта мРНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 09-04-00723 и 10-04-00757) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

ОБРАЗОВАНИЕ РАДИАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ МИКРОТРУБОЧЕК В БЕСЦЕНТРОСОМНЫХ ЦИТОПЛАСТАХ ЗАВИСИТ ОТ ЛИНИИ КЛЕТОК И ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ ОРГАНЕЛЛАМИ РАННЕГО ВЕЗИКУЛЯРНОГО ТРАНСПОРТА. © И. Б. Бродский,¹ А. В. Бураков,¹ Е. С. Надеждина.^{1,2} ¹НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ им. М. В. Ломоносова и ²Институт белка РАН, Пушкино, Московская обл.

Интерфазные микротрубочки (МТ) в большинстве типов культивируемых клеток и в некоторых дифференцированных клетках *in situ* организованы в радиальную систему: к периферии клетки они отходят от центра организации, которым в большинстве случаев служит centrosoma. На centrosome начинается рост МТ и закрепляются их минус-концы. Однако радиальная система МТ может образовываться и без участия centrosome. Такая система обнаружена, например, в бесцентриолярных фрагментах меланофоров рыб, и организаторами этой системы служат меланосомы. В монослойе клеток эпидермиса МТ образуют радиально-подобную систему без выраженного центра, где МТ отходят от околоядерной области в направлении к периферии. Другие, помимо centrosome, центры организации системы МТ изучены недостаточно. Centrosoma обычно является доминирующим центром организации МТ, и в ее присутствии остальные центры организации МТ могут быть незаметны. Предполагают, что в организации системы МТ в клетках млекопитающих участвуют динеин-динактиновые комплексы, связанные транспортными везикулами или органеллами аппарата секреторного транспорта. Сами везикулы могут организовывать МТ, нуклеируя их, ассоциируясь с ними и передвигаясь по ним, подобно пигментным гранулам во фрагменте меланофора.

Мы исследовали организацию МТ на экспериментальной модели бесцентросомных цитопластов — безядерных клеток, используя цитопласты, не содержащие centrosome. В данной работе мы использовали три культуры клеток, две из них эпителиального происхождения — HeLa и BSC-1, а третья — фибробластоподобная культура Vero. При этом радиальную систему МТ образовывали лишь бесцентросомные цитопласты линий HeLa и BSC-1 и нуклеация микротрубочек происходила в центральной области таких цитопластов. Мы установили, что при деполимеризации МТ нокадазолом и их последующем восстановлении на малых временах короткие МТ, ко-локализованные с мембранами аппарата Гольджи (АГ), появляются лишь в клетках эпителиального происхождения, тогда как в клетках Vero мы такого не наблюдали.

В центральной области бесцентросомного цитопласта находятся как АГ, так и органеллы раннего везикулярного транспорта — сайты экспорта из эндоплазматического ретикулума (ERES) и промежуточный компартмент (ERGIC). Однако концентрирование двух последних органелл в центральной области цитопласта характерно лишь для эпителиальных линий. Концентрирование ERES и ERGIC в линии Vero зависит от наличия компактной структуры АГ и при его разрушении действием брефель-

дина А органеллы раннего везикулярного транспорта оказываются распределенными по всей цитоплазме.

Сама же бесцентросомная радиальная система МТ устойчива к действию брефельдина А, однако разрушается при воздействии ингибиторов СОП-зависимого транспорта — оадаевой кислоты и мутанта малой ГТФазы Sar1a[T39N]. Экспрессия Sar1a[T39N] в клетках BS-C-1 также приводит к хаотизации системы МТ, что может говорить о значительной роли внецентросомных (организованных органеллами раннего везикулярного транспорта) МТ в организации общей системы МТ в данных клетках.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 08-04-01697-а и 11-04-01022-а).

РОЛЬ АППАРАТА ГОЛЬДЖИ В ОРГАНИЗАЦИИ СИСТЕМЫ МИКРОТРУБОЧЕК В РАЗЛИЧНЫХ КЛЕТКАХ. © А. В. Бураков,¹ А. И. Фокин,¹ Е. С. Надеждина.² ¹НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ им. М. В. Ломоносова и ² Институт белка РАН, Москва.

Микротрубочки (МТ) служат для разделения хромосом между дочерними клетками в митозе и для перемещения по цитоплазме органелл в интерфазе. Этим определяется строение системы МТ: в митозе они формируют биполярное веретено деления, а в интерфазе — более или менее выраженную радиальную звезду. Расположение МТ в клетках может влиять на внутриклеточный транспорт и на движение клеток. Для радиальной организации МТ необходимо наличие центра их организации, ЦОМТ, осуществляющего одновременно два процесса — нуклеацию новых МТ и закоривание уже существующих. Двумя этими качествами обладает центросома, состоящая из центриолей, окруженных перичентриолярным материалом, и расположенная в центральной области клетки. Как было показано ранее (Burakov et al., 2008. Traffic. 9 : 472—480), утрата способности к закориванию приводит к потере центросомой функции ЦОМТ и к дезорганизации МТ, причем процесс нуклеации МТ на центросоме остается незатронутым.

Не так давно были получены данные о возможности затравки МТ на мембранах аппарата Гольджи (Efimov et al., 2007. Develop. Cell. 12 : 917—930). Аппарат Гольджи (АГ) представляет собой стопку плоских цистерн, компактно расположенных в центре клетки, как и центросома. Может ли АГ осуществлять одновременно функции нуклеации и закоривания МТ в клетках разных линий?

Мы использовали в работе две линии культивируемых клеток, происходящих из эпителия почки зеленой мартовки: Vero и BS-C-1. В обеих линиях клеток система МТ радиальна: они сходятся минус-концами в центральную область, где расположена центросома. Однако в клетках BS-C-1 центросома может находиться на некотором расстоянии от зоны схождения большинства МТ (Rodionov et al., 1999. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 96 : 115—120).

Путем тройного иммунофлуоресцентного окрашивания клеток антителами к α -тубулину, γ -тубулину и маннозидазе-II мы показали, что МТ в них отходит как от центросомы, так и от АГ. Это наиболее очевидно в случаях, когда расположение центросомы и АГ не совпадает. Так как нарушение закоривания на ЦОМТ приводит к

его дисфункции и хаотизации МТ (Burakov et al., 2008. Traffic. 9 : 472—480), мы сделали вывод о том, что АГ способен удерживать МТ. Разрушение АГ брефельдином А приводило к возрастанию числа клеток BS-C-1 с хаотичными МТ, причем одновременно увеличивалось число клеток, где МТ сходились строго к центросоме. В клетках Vero брефельдин А не приводил к такой дезорганизации МТ.

Мы также сравнили места нуклеации МТ в клетках Vero и BS-C-1 путем центрифужной видеомикроскопии клеток, экспрессирующих EB3-GFP. После окончания съемки клетки фиксировали и проводили двойное окрашивание антителами к белкам-маркерам центросомы и АГ. Мы показали, что в клетках Vero нуклеация происходит на центросомах, в то время как в клетках BS-C-1 она идет в равной степени на центросоме и на мембранах АГ. Следовательно, АГ способен выполнять обе функции, присущие ЦОМТ, — затравку и удержание МТ в клетках линии BS-C-1, но не в клетках Vero.

Таким образом, АГ может организовывать МТ, но его роль как ЦОМТ существенно различается даже у близких по происхождению клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта президента РФ № МК-3444.2010.4 и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 11-04-01022-а).

ЭКСПРЕССИЯ И ВОЗМОЖНАЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ РЕЦЕПТОРА ВНЕКЛЕТОЧНОГО КАЛЬЦИЯ ВО ВКУСОВЫХ КЛЕТКАХ. © М. Ф. Быстрова, Р. А. Романов, О. А. Розачевская, Г. Д. Чурбанов, А. А. Хохлов, С. С. Колесников. Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Московская обл.

Во вкусовой почке идентифицированы три типа (тип I, тип II и тип III) морфологически и функционально различных вкусовых клеток, которые также различаются по профилю экспрессии генов рецепторных, сигнальных и канальных белков. Так, клетки типа II экспрессируют гены рецепторных белков семейств T1R и T2R, обеспечивающих трансдукцию вкусовых веществ категорий сладкий, горький и умами (umami). Семейство T1R включает в себя три рецептора T1R1—T1R3, которые принадлежат к подсемейству C в суперсемействе GPCR (G-protein-coupled receptor) рецепторов, куда также входят метаболитные рецепторы глутамата и ГАМК, рецептор внеклеточного Ca^{2+} CASR (extracellular Ca^{2+} -sensing receptor) и ряд рецепторов с неизвестной функцией (orphan receptors).

Недавно нами было установлено, что CASR экспрессируется во вкусовой ткани. Профиль его экспрессии анализировали на уровне одиночных вкусовых клеток методом экспоненциальной амплификации РНК, транскрипты CASR были идентифицированы в клетках типа I и типа III. Первоначально CASR был идентифицирован в околотитовидной железе, где он ответствен за регуляцию секреции паратироидного гормона в зависимости от концентрации Ca^{2+} в плазме крови. Позднее CASR был идентифицирован в нейрональных, мышечных и эпителиальных тканях, где его физиологическая функция окончательно не установлена. Также неясна роль CASR в физиологии вкусовых клеток.

CASR является полимодальным GPCR, который стимулируется широким набором разнородных агонистов,

включая поливалентные катионы (Ca^{2+} и Mg^{2+}), полиамины, аминокликозидные антибиотики, кальцимитетики, ароматические аминокислоты и даже пептиды. В столь гетерогенном наборе агонистов вполне может найтись место и вкусовым веществам — во всяком случае, некоторые аминокислоты, Ca^{2+} и Mg^{2+} , которые обладают вкусовой активностью, уже находятся в этом ряду.

С целью исследовать фармакологический профиль CASR рецептор был клонирован из вкусовой ткани в вектор pIRES2-EGFP и гетерологически экспрессирован в клетках линии HEK-293. Используя Ca^{2+} -зонды Fura-2 и Fluo-4 и микрофотометрию, исследовали физиологические ответы CASR-положительных клеток на различные агонисты, включая Ca^{2+} , аминокислоты, кальцимитетик NPS R-568 и ряд сладких и горьких веществ. Показано, что фенилаланин, глутамат, аргинин, NPS R-568 и горький денатоний стимулируют Ca^{2+} -сигнализацию в трансфицированных, но не в контрольных клетках HEK-293, в то время как горькие циклоексимид и октаацетат сахарозы, а также сладкие аспартам, неотам и SC45647 были неэффективны. Получена зависимость клеточных ответов от концентрации внеклеточного Ca^{2+} . Показано, что аминокислоты NPS R-568 и денатоний не стимулируют Ca^{2+} -сигнализацию в отсутствие наружного Ca^{2+} , но увеличивают чувствительность CASR-положительных клеток HEK-293 к внеклеточному Ca^{2+} , сдвигая кривую доз-ответ в сторону меньших концентраций Ca^{2+} .

Исследованы ответы CASR-положительных вкусовых клеток к агонистам CASR и показано, что клетки типа I специфически отвечают на денатоний, а клетки типа III — на аминокислоты. Подобное различие в чувствительности можно объяснить агонистозависимым переключением CASR на различные сигнальные каскады. Таким образом, во вкусовых клетках CASR может выполнять роль рецептора определенных вкусовых веществ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 10-04-01230, 10-04-01105 и 11-04-00057), гранта президента РФ (МК-751.2010.4) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

РОЛЬ МИКРОТРУБОЧЕК В УПОРЯДОЧЕННОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ АППАРАТА ГОЛЬДЖИ В КЛЕТКАХ КОРНЯ ПШЕНИЦЫ *TRITICUM AESTIVUM* L. © Ван Вэньчжу, Е. М. Лазарева, Е. А. Смирнова. Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова.

Локализация внутриклеточных органелл меняется в клеточном цикле и на каждой стадии органеллы занимают в цитоплазме определенное положение. В результате цитоплазма разделяется на структурно-функциональные домены или компартменты, в которых проходят разнообразные метаболические и биохимические процессы. Компартментализация цитоплазмы является признаком, характерным для многих растительных клеток, проходящих стадии поляризованного роста и дифференцировки. Однако механизмы, которые обеспечивают и поддерживают компартментализацию цитоплазмы в клетках растений, изучены недостаточно. Целью работы было установить, есть ли связь между системой микротрубочек и локализацией аппарата Гольджи (АГ) в интерфазных и митотических клетках корня пшеницы *Triticum aestivum* L. Был проведен анализ взаимного расположения микротрубочек

и АГ во время интерфазы и разных стадий митоза, а затем исследована локализация АГ после разборки микротрубочек и при ингибировании сборки микротрубочек колхицином. Микротрубочки выявляли с помощью антител к тубулину, АГ — с помощью антител к белку p58K. Было установлено, что в интерфазных клетках диктиосомы АГ присутствовали во всей цитоплазме, но скапливались преимущественно в околядерной области. В начале митоза диктиосомы перераспределились из околядерной области на периферию профазного веретена. В прометафазе—анафазе они располагались на периферии митотического веретена и часто аккумулировались над его полюсами. В анафазе—телофазе диктиосомы выявлялись вокруг хромосом и ядер дочерних клеток. Они также присутствовали в зоне формирования фрагмопласта и вносили вклад в формирование клеточной пластинки. После разрушения микротрубочек и при ингибировании их сборки были выявлены изменения в локализации и распределении АГ. В интерфазных клетках скопление диктиосом в околядерной области, типичное для контрольных клеток, было выражено значительно слабее, в результате чего наблюдалось более равномерное распределение АГ в цитоплазме. Отсутствие микротрубочек веретена вызывало переход клеток в К-митоз. На стадии К-метафазы диктиосомы АГ были выявлены вокруг и между хромосомами, что значительно отличалось от локализации АГ в ходе нормального митоза, когда диктиосомы вытеснялись из зоны расположения хромосом и располагались на периферии веретена. Кроме этого, как в интерфазных, так и в митотических клетках присутствовали крупные скопления диктиосом АГ, расположенные в кортикальной цитоплазме. Скопления диктиосом имели вид цепочек, кластеров и даже тяжей. Таким образом, отсутствие микротрубочек вызывает изменения в локализации и распределении АГ, что указывает на возможное участие микротрубочек в поддержании упорядоченной организации цитоплазмы.

ИЗМЕНЕНИЕ ПРОДУКЦИИ КОЛЛАГЕНА ФИБРОБЛАСТАМИ 3T3-SV40 ПРИ ДЕЙСТВИИ АНТИОКСИДАНТОВ. © Е. А. Вахромова, К. М. Куртчишкова, И. В. Воронкина, И. А. Гамалей. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, vakhromova.cath@gmail.com.

Состав и пространственная организация внеклеточного матрикса (ВКМ) могут в значительной степени влиять на взаимодействие клеток друг с другом. Ранее было показано, что антиоксиданты N-ацетилцистеин (НАС) и альфа-липоевая кислота (АЛА) изменяют поверхностные свойства трансформированных клеток, что выражается в изменении их чувствительности к бактериальной инвазии и литическому действию естественных киллерных клеток. В данной работе мы выяснили влияние НАС (5 и 10 мМ) и АЛА (1.25 мМ) на продукцию мышечными трансформированными фибробластами 3T3-SV40 одного их главных компонентов ВКМ — коллагена I типа. С помощью иммунофлуоресценции и конфокальной микроскопии показали, что испытываемые соединения по-разному меняют уровень коллагена, секретируемого на клеточную поверхность. При действии НАС продукция коллагена (интенсивность флуоресценции меченых антител к коллагену) либо не изменяется, либо незначительно падает относительно контрольного уровня, а при действии АЛА значительно увеличивается. Удаление антиоксидантов НАС или АЛА сменой среды приводит к постепен-

ному восстановлению исходного уровня продукции коллагена. Эти различия отражают, по-видимому, разные механизмы действия этих веществ на клетки. Для регистрации изменений, вызванных NAC, требуется длительное время его действия (более 4 ч), что может говорить об изменении генной экспрессии и синтеза белка *de novo*. Антиоксидант ALA вызывает быстрые изменения уровня продукции коллагена, что может отражать изменение секреции его клетками. Сопоставление количественных изменений коллагена на поверхности клеток с изменениями их функциональных свойств при действии антиоксидантов позволяет заключить, что именно увеличение синтеза и (или) секреции коллагена при действии NAC или ALA сопровождается потерей клетками чувствительности к литическому действию естественных киллерных клеток или к бактериальной инвазии. Таким образом, реорганизация компонентов ВКМ при действии антиоксидантов может быть важным этапом в изменении свойств трансформированных клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00467), гранта президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-3273.2010.4) и программы РАН «Молекулярная и клеточная биология».

ПРОИЗВОДНЫЕ КИНАЗОЛИНА — ИНГИБИТОРЫ АНОМАЛЬНОГО ДЕПОЗАВИСИМОГО ВХОДА КАЛЬЦИЯ В КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА. © В. А. Вигонт, О. А. Зими́на, Л. Н. Глушанкова, И. Б. Безпрозванный, Е. В. Казначеева. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Vvigand@gmail.com.

Кальций является одним из наиболее универсальных вторичных посредников и регулирует множество таких важных клеточных процессов, как апоптоз, пролиферация и дифференцировка. 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 за счет выброса кальция из внутриклеточного депо и за счет входа 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 Хантингтона является нейродегенеративным заболеванием, при котором поражаются преимущественно нейроны стриатума. Данное заболевание связано с мутацией в гене белка Хантингтона, следствием которой является увеличение длины полиглутаминового тракта в N-концевой области Хантингтона. В норме длина этого тракта не превышает 35 глутаминовых остатков. В последнее время появляются данные, указывающие на взаимосвязь между болезнью Хантингтона и нарушениями в кальциевой сигнализации.

В качестве модели болезни Хантингтона была выбрана линия клеток нейробластомы SK-N-SH, в которой был экспрессирован ген мутантного Хантингтона со 138 остатками глутамина в тракте (138Q). В качестве контроля использовали клетки той же линии с Хантингтоном, содержащим 15 остатков глутамина в своем полиглутаминовом тракте (15Q).

Было показано, что в клетках 138Q, экспрессирующих мутантный Хантингтон, депозависимый вход кальция существенно (в 4—5 раз) выше, чем в контрольных клетках 15Q.

Было исследовано влияние на этот вход производных киназолина — EVP-компаундов. Добавление активного EVP4593 в концентрации 300 нМ приводило к угнетению депозависимого входа кальция в обоих типах клеток, в то время как неактивный EVP14808 не оказывал на кальциевый вход какого-либо эффекта.

Дальнейшие исследования с использованием метода РНК-интерференции показали, что депозависимый вход кальция в клетках 138Q в основном опосредован каналами, имеющими в своем составе субъединицу TRPC1.

Работа выполнена при финансовой поддержке госконтрактов № 14.740.11.0924 и П332 Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-00956), гранта президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-3796.2010.4) и программы президиума РАН МКБ — грант фонда Дмитрия Зимина «Династия».

ИНДУКЦИЯ АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ РАЗВИТИИ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ. © Т. О. Волкова, О. В. Курмышкина, П. И. Ковчур, У. С. Багина, И. Е. Бахлаев, Н. Н. Немова. Петрозаводский государственный университет.

Апоптоз является физиологическим механизмом устранения избыточных и (или) функционально аномальных клеток, необходимым как для нормального развития многоклеточного организма в эмбриональном периоде, так и для поддержания тканевого гомеостаза у взрослых особей. Нарушения механизмов индукции апоптоза могут являться важным фактором патогенеза различных заболеваний, в том числе онкологических. В настоящей работе изучены процессы индукции апоптоза лимфоцитов периферической крови (ЛПК) у больных с дисплазиями и раком шейки матки (РШМ). Уровень клеточного апоптоза анализировали по экспрессии каспаз методом ПЦР в режиме реального времени и активности данных ферментов в реакции со специфическим субстратом, меченным флуоресцентной меткой, а также цитофлуориметрически с помощью двойного окрашивания пропидием йодида и FITC-меченного аннексина V (ANNEXIN V FITC, Beckman Coulter, Франция), обладающего сродством к мембранно-связанному фосфатидилсерину. Кроме того, методом иммунофенотипирования определяли количество CD95+ лимфоцитов в крови. Обследовано 90 пациенток в возрасте от 20 до 69 лет (средний возраст — 45.3 ± 3.2 г.). Дисплазия выявлена у 20 женщин. С преинвазивной карциномой было 25 женщин, с I стадией злокачественного процесса — 15, со II стадией — 15 и с III стадией — 15 пациенток. Диагноз дисплазии и РШМ поставлен на основании клинических данных и подтвержден кольпоскопически, цитологически и гистологически. Контрольную группу составили 30 здоровых небеременных женщин, сопоставимых по возрасту, данным анамнеза и не имеющих патологии шейки матки. Показано, что количество CD95+ клеток в крови, начиная со стадии преинвазивной карциномы, возрастает, максимальное увеличение отмечается на I—II стадиях РШМ. В это время в лимфоцитах также регистрируется резкое повышение экспрессии и активности каспаз-8, 6- и 3-, экспрессия и активность каспа-

зы-9 снижена. Количество мембранно-связанного фосфатидилсерина при прогрессии РШМ (I → II → III стадии) резко увеличивается. При слабой и умеренной дисплазии в ЛПК подобных изменений не выявлено, определяемые показатели не отличаются от таковых контрольной группы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при прогрессии опухоли в лимфоцитах периферической крови активируются процессы апоптоза, которые в свою очередь являются следствием увеличения на мембране клеток молекул CD95 и повышения внутриклеточной активности каспаз-8, -6 и -3.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-3731.2010.4).

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ РАННЕГО ПРОЛИФЕРАТИВНОГО ОТВЕТА В ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ. © Т. О. Волкова, О. В. Курмышкина, П. И. Ковчур, И. Е. Бахлаев, Н. Н. Немова. Петрозаводский государственный университет.

Гены раннего пролиферативного ответа (*c-myc*, *c-fos* и *c-jun*) активируются при стимуляции покоящихся клеток ростовыми факторами и участвуют в регуляции процессов клеточной пролиферации и дифференцировки. В ряде работ показано, что изменение их экспрессии является одним из центральных событий канцерогенеза. На сегодняшний день известно, что гены раннего ответа и геном вируса папилломы человека влияют друг на друга в процессе злокачественной трансформации клеток цервикального эпителия. Кроме того, накапливаются данные о диагностической и прогностической значимости уровня экспрессии ранних генов при дисплазии и раке шейки матки (РШМ). Тем не менее большинство вопросов, касающихся установления связи между активностью генов раннего ответа и клинико-патологическими характеристиками РШМ, остаются открытыми. В настоящей работе изучена экспрессия генов *c-myc*, *c-fos* и *c-jun* (на уровне мРНК и белка) в опухолевой ткани больных РШМ в зависимости от степени тяжести процесса. Экспрессию генов анализировали методом ПЦР в режиме реального времени, идентификацию белков проводили Вестерн-блоттингом с использованием мышинных моноклональных антител (Santa Cruz Biotechnology, CA). Обследовано 90 пациенток в возрасте от 20 до 69 лет (средний возраст — 45.3 ± 3.2 г.). Дисплазия выявлена у 20 женщин. С преинвазивной карциномой было 25 женщин, с I стадией злокачественного процесса — 15, со II стадией — 15, с III стадией — 15 пациенток. Диагноз дисплазии и РШМ поставлен на основании клинических данных и подтвержден кольпоскопически, цитологически и гистологически. Контрольную группу составили 30 здоровых небеременных женщин, сопоставимых по возрасту, данным анамнеза и не имеющих патологии шейки матки. Показано, что в зависимости от активности генов раннего ответа в опухолевой ткани пациенток можно разделить на две группы. Первую группу составляют женщины, у которых наблюдаются достоверное увеличение экспрессии *c-myc* и *c-fos* и уменьшение *c-jun*; вторую — те, у которых, напротив, имеет место повышение экспрессии *c-jun* и снижение *c-myc* и *c-fos* (изменения регистрируются на уровне как мРНК, так и белка). Следует отметить, что подобная закономерность выявляется только при дисплазиях и на стадии преинва-

зивной карциномы. При прогрессии РШМ (I → II → III) отмечается увеличение экспрессии всех изучаемых генов, однако подобное увеличение в случае *c-myc* и *c-fos* более выражено, чем в случае *c-jun*. В работе обсуждаются возможные причины изменения активности генов раннего ответа при развитии РШМ, участие их продуктов в передаче внутриклеточного сигнала, а также прогностическая значимость для данной онкопатологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-3731.2010.4).

УЧАСТИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В РЕГУЛЯЦИИ БАРЬЕРНОЙ ФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ. © И. И. Галкин, Е. Н. Попова, О. Ю. Плетюшкина. НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ им. М. В. Ломоносова.

Эндотелий сосудов образует полупроницаемый барьер, регулирующий ток жидкостей и растворенных веществ (в том числе белков плазмы) между кровяным руслом и окружающими тканями. Нарушение барьерной функции эндотелия приводит к развитию атеросклероза, а также ассоциированных с диабетом сосудистых дисфункций. Эндотелиальная проницаемость главным образом определяется состоянием межклеточных контактов, которые могут собираться и разбираться в ответ на различные стимулы, такие как фактор некроза опухолей альфа (TNF α). TNF α , как и многие другие цитокины, индуцирует генерацию активных форм кислорода (АФК). Митохондрии — основной источник АФК в клетке. Мы предположили, что митохондриальные АФК могут участвовать в передаче сигнала перестройки цитоскелета и разборки межклеточных контактов от TNF α . Для проверки этого предположения мы использовали в качестве инструмента митохондриально-направленные антиоксиданты группы SkQ, разработанные в лаборатории В. П. Скулачева.

Мы показали, что TNF α вызывает существенные перестройки актинового цитоскелета в эндотелиальных клетках линий ECV304 и EAhy926: форма клеток становится веретеновидной, появляются стресс-фибриллы. Одновременно с этим наблюдалось уменьшение количества тотальных кадгеринов и β -катенина в местах соединения клеток. Антиоксиданты группы SkQ существенно ослабляли эти эффекты TNF α . После разборки межклеточных контактов кадгерин подвергается протеолизу и их содержание в клетке падает. TNF α вызывал существенное снижение содержания специфичного для эндотелия кадгерина — VE-кадгерина — в клетках линии EAhy926. SkQ ингибировали действие цитокина. Действие антиоксидантов зависело от дозы, оптимальной оказалась концентрация 20 нМ. Более высокие, как и более низкие, концентрации SkQ были менее эффективными.

TNF α стимулирует перестройки цитоскелета и разборку межклеточных контактов за счет повышения уровня Ca²⁺ в цитоплазме, активации киназы легкой цепи миозина (MLCK), а также малой ГТФазы RhoA. Такие сигнальные молекулы, как NF κ B и p38, также могут способствовать этим процессам. В ряде клеточных систем показано, что сигнальные пути RhoA, NF κ B и p38 могут активироваться под действием АФК. Мы предполагаем, что SkQ могут ингибировать эффекты TNF α , воздействуя

на эти сигнальные пути, и планируем проверить наше предположение в дальнейшем.

РОЛЬ ЦИТОСКЕЛЕТА В ПРОЦЕССЕ КЛЕТОЧНОГО КАННИБАЛИЗМА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ЭПИДЕРМОИДНОЙ КАРЦИНОМЫ ЧЕЛОВЕКА А431.
© А. С. Гаранина, М. А. Савицкая, Г. Е. Онищенко. Кафедра клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова.

Еще в начале XX в. внимание ученых привлек уникальный феномен «клетка-в-клетке». Он получил название клеточного каннибализма (КК). КК в некоторых случаях используется для диагностики заболеваний и прогноза развития опухолей, однако точные механизмы этого явления до сих пор не изучены. На данный момент существует гипотеза, согласно которой в основе КК лежит активное проникновение одной клетки внутрь другой за счет акто-миозинового сокращения. Однако эти данные получены лишь на клетках, находящихся в суспензии. В связи с этим целью работы было исследовать роль цитоскелета в процессе КК в субстратзависимой культуре клеток эпидермоидной карциномы человека А431. В работе использованы методы световой, флуоресцентной и видеомикроскопии, трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии (ТЭМ и СЭМ). При исследовании актинового цитоскелета клеток выявлено, что на ранних стадиях КК в местах контакта поглощенной и поглощающей клеток присутствуют области с высоким содержанием актина. На основании данных, полученных методом СЭМ, предложен следующий гипотетический механизм внедрения одной клетки в другую: клетка-жертва после прикрепления к клетке-мишени внедрения начинает продавливать мембрану поглощающей клетки и оказывается погруженной в глубокую впадину (кратер) в теле поглощающей клетки. После этого клетка-мишень внедрения формирует псевдоподию, которая закрывает данный кратер сверху. Для выяснения роли актиновых микрофиламентов в процессах внедрения одной клетки в другую мы использовали агенты, которые нарушают организацию цитоскелета. Обнаружено, что при действии Y27632 (ингибитора ROCK) число случаев КК уменьшается вдвое, а при нарушении сборки актиновых микрофиламентов воздействием цитохалазином B — втрое. Это означает, что нарушение реорганизации актинового цитоскелета значительно подавляет процессы КК. Далее известно, что за форму и подвижность клеток помимо актинового цитоскелета может отвечать система микротрубочек. Микротрубочки также обеспечивают перемещение мембранных органелл клетки. При исследовании распределения микротрубочек обнаружено, что в клетках-мишенях внедрения на начальных этапах КК микротрубочки располагаются в виде плотных тяжей вокруг поглощенной клетки. В ходе КК выявляется перераспределение аппарата Гольджи, лизосом и митохондрий поглощающей клетки, что, по-видимому, создает необходимые условия для переваривания поглощенной клетки. Для выяснения роли микротрубочек в процессах внедрения одной клетки в другую и процессах деградации внедрившейся клетки культуру А431 обрабатывали нокодазолом, разрушающим микротрубочки. Обнаружено, что воздействие нокодазолом вызывает увеличение размеров мембранных органелл и их хаотичное распределение в поглощающей клетке. Однако процесс переваривания поглощенной клетки не прерыва-

ется. При длительном воздействии начальные стадии КК не обнаруживаются, и в конечном итоге число случаев КК снижается практически до нуля. Таким образом, можно предположить, что в процессах внедрения одной клетки в другую участвуют как актиновый цитоскелет, так и система микротрубочек. При этом микротрубочковый цитоскелет также обеспечивает перераспределение мембранных органелл при КК, но, по-видимому, не играет решающей роли на заключительных этапах деградации поглощенной клетки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 11-04-01518-а).

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ Fas-ЛИГАНДА В ЛИПИДНЫХ МИКРОДОМЕНАХ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ. © К. А. Глухова, К. А. Тризна, О. В. Прусакова, И. П. Белецкий. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Московская обл.

Апоптотическая гибель клеток является одним из важнейших механизмов регуляции жизнедеятельности организма, опосредуя такие значительные события, как селекция лимфоцитов или поддержание иммунопривилегированности органов. При всем многообразии возможных сценариев данного процесса особый интерес представляет инициация апоптоза при участии Fas-лиганда. Несмотря на то что процессы, протекающие после активации его рецептора Fas, детально изучены и описаны, исследование механизмов, предшествующих данному явлению, остается актуальным. Один из путей реализации цитотоксических свойств Fas-лиганда сопряжен с транспортом его в обогащенные холестеролом и сфинголипидами микродомены плазматической мембраны. До настоящего времени остается открытым вопрос о значимости липидных доменов плазматической мембраны для функционирования лиганда. Целью данной работы стало изучение механизмов, отвечающих за регуляцию цитотоксической активности Fas-лиганда.

Для этого была получена культура клеток HeLa с индуцибельной экспрессией Fas-лиганда. Было показано, что через несколько часов после индукции новосинтезированный Fas-лиганд обнаруживается в устойчивых к детергенту липидных микродоменах в комплексе с одним из основных резидентных белков — кавеоломином-1. При использовании делеционного мутагенеза было выявлено, что в образовании комплекса могут быть задействованы как C-, так и N-концевой домены кавеолина, а в молекуле Fas-лиганда принимают участие аминокислоты в участке 1-43 а. о. О возможном влиянии кавеолина на активность Fas-лиганда свидетельствует тот факт, что делеция 1-43 а. о. во внутриклеточном домене лиганда приводит не только к нарушению комплексообразования, но и к снижению цитотоксичности. При этом, по-видимому, взаимодействие носит многоочечный характер, что наталкивает на мысль об участии кавеолина в олигомеризационных процессах в молекуле Fas-лиганда. Так или иначе, взаимодействие кавеолина и лиганда может играть важную роль в проявлении функциональных свойств последнего. Дальнейшие исследования в этом направлении позволят получить более детальную картину организации Fas-лиганда в липидных микродоменах и открыть новые

возможности регуляции апоптоза на этапах транспорта и активации.

РЕОРГАНИЗАЦИЯ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА И МЕЖКЛЕТОЧНЫХ АДГЕЗИОННЫХ КОНТАКТОВ ПРИ НЕОПЛАСТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК. © Н. А. Глушанкова. Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва.

Разрушение межклеточной адгезии и приобретение эпителиальными клетками подвижности — закономерные этапы прогрессии опухолей эпителиального происхождения — карцином. Угнетение экспрессии Е-кадгерина, образующего межклеточные адгезионные контакты (АК), часто рассматривается как пусковой механизм инвазии опухолевых клеток. Вместе с тем хорошо известно, что многие опухоли сохраняют экспрессию Е-кадгерина, что свидетельствует о возможности существования механизмов, запускающих инвазию, не связанных с угнетением экспрессии и аккумуляции на мембране Е-кадгерина. При исследовании в качестве модели мы использовали линию нетрансформированных эпителиоцитов IAR-2, а также линию трансформированных диметилнитрозамином эпителиоцитов IAR-6-1, образующих опухоли при прививке сингенным крысам.

Клетки линии IAR-6-1 сохраняли экспрессию Е-кадгерина и в конфлюэнтной культуре формировали монослой, сходный с монослоем нетрансформированных эпителиоцитов IAR-2. Вместе с тем флуоресцентно-микроскопическое исследование выявило существенные изменения в организации актинового цитоскелета и АК клеток IAR-6-1 по сравнению с нетрансформированными эпителиоцитами IAR-2. В трансформированных эпителиоцитах IAR-6-1 исчезали краевой актиновый пучок и периферические пучки, а содержащиеся Е-кадгерин адгезионные пояса (тангенциальные АК), характерные для нормальных эпителиоцитов, замещались кластерами, ориентированными перпендикулярно межклеточной границе (радиальными АК). Видеомикроскопическое исследование нетрансформированных и трансформированных эпителиоцитов, стабильно экспрессирующих меченный GFP Е-кадгерин, показало, что в отличие от тангенциальных АК радиальные АК трансформированных клеток высокодинамичны и нестабильны. В зоне контакта клеток IAR-6-1 АК формировались в виде точек, которые связывались с прямыми актиновыми пучками и постепенно увеличивались в размере. Образование радиальных АК критически зависело от контрактильности актин-миозина. Актинсвязывающие белки зиксин и альфа-актинин аккумуляровались в зоне межклеточного взаимодействия клеток IAR-6-1 уже на стадии точечных АК. Анализ кимограмм показал, что в культуре IAR-6-1 отсутствовал контактный паралич псевдоподиальной активности, характерный для нетрансформированных эпителиоцитов. Мы предполагаем, что различия в актиновом цитоскелете между нетрансформированными и трансформированными эпителиоцитами, в частности наличие либо отсутствие краевого пучка, определяют поведение клетки при контакте с другими клетками.

Трансформированные эпителиоциты IAR-6-1 легко разрывали межклеточные связи и мигрировали по подложке на значительные расстояния как в составе группы клеток (коллективная миграция), так и индивидуально,

образуя при встрече с другими клетками новые контакты. Несмотря на более высокую скорость движения одиночных клеток IAR-6-1 в сравнении со скоростью клеток в составе групп, направленность движения клеток в группе была существенно выше, чем направленность одиночных клеток. Можно предположить, что исчезновение краевого актинового пучка и реорганизация содержащих Е-кадгерин АК в ходе неопластической трансформации эпителиоцитов могут приводить к разрушению стабильной межклеточной адгезии и приобретению клетками локомоторного фенотипа. Пластичность содержащих Е-кадгерин-АК, с одной стороны, позволяет трансформированным клеткам реализовать свою способность к индивидуальной миграции, с другой — важна для их эффективной коллективной миграции.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ТРАНСПОРТА ВОДЫ КЛЕТКАМИ MDCK. © А. Н. Горшков, Е. С. Снигиревская, Я. Ю. Комиссарчик. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Монослой клеток MDCK является модельным объектом для анализа процессов направленного транспорта различных веществ, в частности ионов и воды. Известно, что в данных клетках одним из важнейших путей внутриклеточной передачи сигнала является протеинкиназа А (ПКА) — сигнальный путь. В нашей работе мы исследовали изменения структурной организации клеток MDCK при стимуляции в них ПКА-сигнального пути, сопряженные с индукцией трансэпителиального потока воды. В работе была использована прямая (воздействие 10^{-4} М активатором ПКА форсколина) и опосредованная V2-рецептором (воздействие 10^{-6} М аргинин-вазопрессина — АВП) активация в них ПКА-сигнального пути.

Установлено, что в условиях действия каждого из вышеуказанных агентов происходит усиление осмотического переноса воды с апикальной на базолатеральную сторону монослоя. Морфологическим выражением этого процесса является формирование крупных блистеров (заполненные жидкостью куполообразные участки монослоя, локально отходящие от твердого субстрата). Воздействию форсколина приводит к значительно более активному блистерообразованию, чем воздействию АВП.

Электронно-микроскопический анализ клеток MDCK обнаружил в них сходный комплекс ультраструктурных изменений при обоих использованных подходах. Отмечены расширение межклеточных щелей и набухание цистерн аппарата Гольджи. В апикальной зоне клеток наблюдается реорганизация клеточной поверхности (увеличение количества микроворсинок, а также появление инвагинаций и выпячиваний апикальной мембраны различной формы). В субмембранной апикальной цитоплазме отмечено появление многочисленных везикул, что говорит об усилении процессов экзо- и эндоцитоза.

Электронная микроскопия обнаружила снижение плотности слоя актиновых микрофиламентов под апикальной мембраной. Использование конфокальной микроскопии с получением серийных оптических срезов по вертикальной оси подтвердило эти данные. С помощью меченя F-актина родамин-фаллоидином было установлено, что в клетках MDCK существуют 3 основных пула актиновых микрофиламентов: 1) апикальный субмембранный актин; 2) актин, ассоциированный с межклеточными контактами; 3) базальный актин (стресс-фибриллы и фокаль-

ные контакты). При воздействии как АВП, так и форсколина отмечена значительная деполимеризация именно апикального субмембранного актина, в то время как 2 других пула актина не претерпевают заметных изменений.

Таким образом, анализ клеток МДСК с помощью электронной и конфокальной микроскопии обнаружил качественно сходный комплекс морфологических изменений в них при прямой и опосредованной V2-рецептором активации ПКА. В количественном отношении воздействие форсколина приводило к более глубоким структурным преобразованиям в клетках, чем воздействие АВП. По нашему мнению, это связано с тем, что АВП наряду с ПКА-сигнальным путем одновременно запускает другие цепи внутриклеточной сигнализации с противоположным действием (в частности, синтез простагландинов), что приводит к более точной и сбалансированной «настройке» величины трансэпителиального водного потока.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 10-04-00419а и 10-04-00018а).

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРЕНОСЧИКОВ ГЛЮКОЗЫ И ЭЛЕМЕНТОВ ЦИТОСКЕЛЕТА В ЭНТЕРОЦИТАХ ТОНКОЙ КИШКИ КРЫСЫ ПРИ ВСАСЫВАНИИ ГЕКСОЗ.
© Н. М. Грефнер,¹ Л. В. Громова,² А. А. Груздков,² Я. Ю. Комиссарчик.¹ ¹ Институт цитологии РАН и ² Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург.

В последние десятилетия в исследованиях, посвященных всасыванию сахаров из просвета кишечника в энтероциты, большое внимание уделяется транспортерам глюкозы SGLT1 и GLUT2. В то же время роль цитоскелета энтероцитов, в частности фибриллярного актина и микротрубочек, в этих процессах исследована недостаточно. В настоящей работе мы анализировали взаимоотношение указанных переносчиков глюкозы и элементов цитоскелета (фибрилярного актина и α -тубулина) в энтероцитах тонкого кишечника крыс при всасывании глюкозы в высоких и низких концентрациях в условиях хронического опыта.

Фрагменты изолированной петли кишечника перфузировали растворами 12.5 и 50 мМ мальтозы. Для анализа распределения переносчиков глюкозы (SGLT1 и GLUT2) и α -тубулина в конфокальном микроскопе Leica TCS SL использовали метод непрямого мечения антителами против указанных белков. Фибриллярный актин окрашивали родамин-фаллоидином. Электронную микроскопию энтероцитов проводили стандартными методами ультратонких срезов на микроскопе JEOL 100U.

В контроле, при нагрузке изолированной петли раствором Рингера, метка к SGLT1 расположена преимущественно в энтероцитах верхней половины ворсинки. При нагрузке кишки раствором мальтозы в концентрации 12.5 мМ метка обнаруживается в энтероцитах по всей длине ворсинки. Участки колокализации SGLT1 и актина микроворсинок обнаруживаются лишь в верхней части ворсинки. При перфузии изолированной петли раствором 50 мМ мальтозы метка к переносчику расположена преимущественно в нижней половине кишечной ворсинки. Там же встречаются участки колокализации переносчика и актина микроворсинок.

Распределение метки к GLUT2 в контроле и при нагрузке 12.5 мМ мальтозы одинаково: метка обнаружи-

вается в энтероцитах верхней половины кишечной ворсинки и на вершине ворсинки колокализована с меткой к актину микроворсинок. При высокой концентрации мальтозы (50 мМ) метка к переносчику расположена вдоль всей ворсинки и участки колокализации меток к переносчику и актину можно обнаружить как в верхней части ворсинки, так и внизу, ближе к криптальной области.

Колокализации меток к α -тубулину и к переносчикам глюкозы не обнаружено. В контроле выявлена колокализация актина и α -тубулина вблизи апикальной мембраны, а при низкой концентрации мальтозы — вблизи латеральной мембраны энтероцитов. Электронная микроскопия позволила визуализировать фибриллярный актин и α -тубулин.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что элементы цитоскелета взаимодействуют с переносчиками глюкозы и участвуют в транспорте сахаров.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-0018-а).

РОЛЬ РЕГУЛЯТОРНОГО КАСКАДА MAPK/ERK В ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМАХ ДОЛГОВРЕМЕННОЙ ПАМЯТИ. © Л. Н. Гринкевич. Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург.

Известно, что для формирования долговременной памяти необходима активная экспрессия генов, которая регулируется внутриклеточными регуляторными сигналами, опосредующими действия условных и безусловных стимулов, вовлекаемых в обучение. Важную роль в регуляции экспрессии генов играет внутриклеточный регуляторный каскад MAPK/ERK. При этом каскад MAPK/ERK способен индуцировать экспрессию на двух уровнях: через фосфорилирование ТФ и через ремоделирование хроматина путем индукции ацетилирования и фосфорилирования гистонов и ряда негистоновых белков.

Удобным объектом для изучения молекулярных механизмов памяти являются животные, обладающие относительно простым устройством ЦНС, в частности моллюски. В качестве модели обучения нами используется выработка условного рефлекса пищевой аверзии у моллюска *Helix*.

Одним из подходов, позволяющих вычлнить ключевые звенья механизмов пластичности, является онтогенетический. Известно, что способность как позвоночных, так и беспозвоночных животных к различным видам обучения созревает неравномерно в процессе развития. Ранее нами показано, что каскад MAPK/ERK и нижележащие ТФ активируются при обучении *Helix*, а дисфункция MAPK/ERK редуцирует способность к обучению. У ювенильных животных, не способных к формированию долговременных форм оборонительных рефлексов, уровень активации MAPK/ERK и нижележащих ТФ существенно ниже, чем у взрослых. Учитывая, что потенциальной мишенью MAPK/ERK кроме ТФ являются гистоны, мы провели исследования по изучению статуса ацетилирования и фосфорилирования гистонов при обучении, а также выяснили возможную связь этих процессов с активацией MAPK/ERK.

Показано, что обучение индуцирует MAPK/ERK-зависимое ацетилирование гистона H3 в структурах ЦНС, связанных с оборонительным поведением, в том числе в нейронах процеребрума (олифакторный центр моллюсков)

и в командных нейронах оборонительного поведения правого париетального ганглия RPa2/3. При этом в симметричных нейронах левого ганглия (LPa2/3) — изменений не обнаружено.

Таким образом, наблюдаемая нами функциональная асимметрия может отражать латерализацию памяти у беспозвоночных. На молекулярном уровне данное явление может быть связано с различным спектром рецепторов, сопряженным с каскадом MAPK/ERK.

У ювенильных животных, подвергнутых процедуре обучения, достоверного изменения ацетилирования гистона H3 не наблюдается. Дисфункция каскада MAPK/ERK у ювенильных животных в значительной мере может быть скомпенсирована через индукцию процессов ацетилирования введением ингибитора деацетилазы бутирата Na. Таким образом, ингибиторы HDAC могут оказаться перспективными для лечения нейродегенеративных заболеваний, связанных с процессом развития.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 11-04-01968).

РЕЦЕПТОРЫ СИСТЕМЫ ГЕНЕРАЦИИ И ПЕРЕДАЧИ БОЛЕВЫХ ИМПУЛЬСОВ — МИШЕНИ ДЕЙСТВИЯ КОМПОНЕНТОВ ПРИРОДНЫХ ЯДОВ. © *Е. В. Гришин*. Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва.

Природные яды представляют собой сложные смеси разнообразных по своей химической природе соединений, которые взаимодействуют с различными клеточными мишенями и направленно модулируют множество физиологических процессов. Особый интерес представляют соединения, обладающие способностью специфично воздействовать на мембранные рецепторы и ионные каналы. Некоторые подобные вещества стали классическими инструментами исследования в нейробиологии. Они используются для направленной регуляции функции нервной клетки и идентификации профиля клеточного набора рецепторов и ионных каналов. В настоящее время найдены компоненты ядов, селективно взаимодействующие практически со всеми известными типами ионотропных систем клеточной мембраны. Эти компоненты подразделяются на блокаторы и модуляторы рецепторной активности. В данной работе представлены результаты по изучению пептидных компонентов природных ядов, модулирующих функциональную активность рецепторов системы генерации и передачи болевых импульсов. Обсуждаются данные по исследованию пептидов, взаимодействующих с потенциалзависимыми Na⁺- и Ca²⁺-каналами, ваниллоидным рецептором TRPV1, пуринергическими P2X-рецепторами и протон-чувствительными рецепторами ASIC.

ПЕПТИДНЫЕ ФРАГМЕНТЫ ШАПЕРОНА Hsp70 КАК СРЕДСТВА ДОСТАВКИ БИОМОЛЕКУЛ В ЖИВЫЕ КЛЕТКИ. © *И. В. Гужова, Е. С. Мартынова, Е. В. Федорова, А. М. Лебедев, Б. А. Маргулис*. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Способность биологических молекул пересекать клеточные мембраны и проникать внутрь живой клетки

представляет большой интерес для разработки таргетных лекарственных средств. Ранее мы показали, что шаперон Hsp70 может проникать в живые клетки разного гистогенеза, и этот факт побудил нас выявить сайт на молекуле шаперона, ответственный за его транспортную способность. С помощью компьютерного анализа трехмерной структуры белка был проведен поиск аминокислотных последовательностей, находящихся на поверхности молекулы и обогащенных положительно заряженными остатками лизина и аргинина. Были выявлены две последовательности из субстратсвязывающего домена шаперона: KRNSTIPTK (415—423 а. о.) и KSTGKANKITITNDKGRLSK (493—512 а. о.), которые были названы KRN- и KST-пептидом соответственно. Биотинилированные формы этих пептидов были синтезированы в Институте высокомолекулярных соединений РАН и исследованы в ряде клеточных тестов. Оказалось, что оба пептида, хотя и с разной эффективностью, способны проникать в клетки, причем скорость проникновения зависит от гистогенеза клеток-реципиентов; динамика вхождения KST-пептида вполне сопоставима с кинетикой интернализации известных транспортных пептидов.

Была исследована способность выявленных пептидов доставлять макромолекулярный груз в живые клетки. Клетки инкубировали с комплексом биотинилированных пептидов с флуоресцентно меченным авидином. Установлено, что авидин, доставленный таким образом в клетки, распределялся по цитоплазме и частично по эндоплазматическому ретикулуму. Локализация авидина была сходной с распределением крупных молекул, переносимых в клетки с помощью известных транспортных пептидов.

Все приведенные данные позволяют считать, что удалось создать новый пептидный транспортер для переноса в живые клетки крупных молекулярных комплексов.

БЕЛКОВО-ЭНЕРГЕТИЧЕСКАЯ НЕДОСТАТОЧНОСТЬ ВЫЗЫВАЕТ СТРУКТУРНЫЕ НАРУШЕНИЯ МЕЖНЕЙРОННЫХ СВЯЗЕЙ В СЕНСОМОТОРНОЙ ЗОНЕ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШЕЙ. © *И. З. Еремينا, О. Б. Саврова, И. Б. Алиева*. Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии медицинского факультета Российского университета дружбы народов, Москва.

В настоящее время получили широкое распространение различные системы снижения веса, основанные на резком ограничении питания либо значительном снижении калорийности потребляемой пищи. Многочисленные нарушения жизнедеятельности организма, выявляемые при использовании таких диет, заставляют оценивать степень риска повреждения всех тканей и органов, а в особенности нервной системы, активно реагирующей на внешние воздействия. В частности, структура синаптических контактов центральной нервной системы обладает значительной пластичностью и напрямую зависит от влияния различных факторов внешней среды. Нами проведена количественная оценка влияния белково-энергетической недостаточности на ультраструктуру синаптических контактов молодых мышей. В эксперименте использованы мыши линии СВА (с 10-х сут жизни), которые в течение 30 сут получали диету с нормальным содержанием белка (10 % казеина) либо диету, ограниченную по белковому составу (5 % казеина). Для исследования выделяли сенсомоторную зону коры больших полушарий, препараты фиксировали и готовили для электронно-микро-

скопического анализа по стандартной методике. Анализировали синапсы, расположенные на шипиковых выростах дендритов, т. е. синапсы одного и того же морфофункционального типа.

Для количественного анализа морфофункциональное состояние каждого синапса оценивали в баллах по следующим признакам: 1) площадь сечения терминали; 2) доля площади сечения терминали, заполненная синаптическими пузырьками; 3) степень концентрации синаптических пузырьков вблизи активной зоны; 4) конфигурация активной зоны — прямая, с положительной или отрицательной кривизной; 5) длина активной зоны; 6) число цистерн в шипиковом аппарате; 7) степень изменения шипикового аппарата; 8) ширина синаптической щели; 9) толщина постсинаптического уплотнения.

Проведенный количественный анализ электронно-микроскопических изображений показал, что к концу эксперимента у ограниченных в питании 40-суточных животных достоверно уменьшаются средняя площадь сечения терминалей, количество синаптических пузырьков, ширина синаптических щелей и толщина постсинаптического уплотнения мембран. При исследовании процентного соотношения прямых активных зон и зон с положительной и отрицательной кривизной у ограниченных в питании животных было обнаружено увеличение числа прямых активных зон, а также уменьшение средней длины активных зон. Статистически достоверного изменения степени концентрации синаптических пузырьков в активных зонах у ограниченных в питании животных не обнаружено. Вместе с тем у ограниченных в питании животных отмечены значительное изменение структуры шипикового аппарата и уменьшение числа его цистерн. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о выраженном влиянии белково-энергетической недостаточности на состояние основных структурных элементов синаптических контактов, расположенных на шипиковых выростах дендритов. Можно предполагать, что недостаточное питание вызывает снижение функциональной активности синаптических контактов, расположенных в сенсомоторной зоне головного мозга, а значит, негативно влияет на состояние и функции нервной системы и организма в целом.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ОРГАНИЗАЦИИ МИКРОТРУБОЧЕК ПРОТЕИНКИНАЗОЙ LOSK.
© О. Н. Жалпарова, С. А. Брянцева, Е. С. Надеждина.
НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ им. М. В. Ломоносова и Институт белка РАН, Москва, olga.zhapparova@gmail.com.

Радиальная система микротрубочек в интерфазных клетках образуется в результате нуклеации и последующего закрепления минус-концов микротрубочек белками периферического материала. Молекулярные механизмы закрепления остаются неясными, хотя существует множество указаний на участие в этом процессе различных белков, в том числе динеин-динактинового комплекса и протеинкиназы LOSK. Основной функцией динактина считается обеспечение связи моторного белка динеина с перевозимым грузом. Присутствие динактина на центросоме является необходимым условием радиальной организации микротрубочек, а ингибирование LOSK приводит к истощению центросомного пула динактина и хаотизации микротрубочек.

Мы обнаружили, что LOSK фосфорилирует субъединицу динактинового комплекса белок p150Glued, и идентифицировали сайт фосфорилирования, который располагается в микротрубочкосвязывающей области p150Glued. Мутанты динактина, имитирующие фосфорилированное (Glu) и нефосфорилируемое (Ala) состояния, различаются по сродству к микротрубочкам и центросоме. Интересно, что Glu-мутант, имеющий меньшее сродство к микротрубочкам, локализуется на центросоме, в то время как Ala-мутант, имеющий большее сродство к микротрубочкам, связывается с центросомой гораздо слабее. При экспрессии Glu-мутанта в клетках с заингибированной LOSK наблюдается восстановление радиальной организации микротрубочек.

Закрепление микротрубочек также зависит от присутствия на центросоме белка Par6a, который транспортируется на центросому динеином, связываясь с ним посредством динактинового комплекса. Мы обнаружили, что ингибирование LOSK приводит к истощению центросомного пула Par6a, что может указывать на возможный молекулярный механизм участия LOSK в радиальной организации микротрубочек.

LOSK также участвует в процессах поляризации клеток, и при ингибировании ее активности наблюдается нарушение переориентации аппарата Гольджи по направлению к ведущему краю. Экспрессия в таких клетках Glu-мутанта p150Glued восстанавливает нормальное расположение аппарата Гольджи в клетках, поляризованных на краю экспериментальной раны в монослое.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта президента РФ № МК-8703.2010.4.

РЕЦЕПТОРЫ ГЛУТАМАТА И АКТИН ЦИТОСКЕЛЕТА В ЦНС НАСЕКОМЫХ В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА КИНУРЕНИНОВ. © Т. Г. Зачепило, А. И. Вайдо, Н. Г. Лопатина. Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, polosataya2@mail.ru.

Цитоскелетные перестройки в нейронах играют важную роль в онтогенезе нервной системы, в процессах синаптической пластичности, в формировании памяти (Edwards, Gill, 1999; Birkenfeld et al., 2001; Priel et al., 2007). Существуют данные о связи состояния актинового цитоскелета с функционированием глутаматных рецепторов. Показано, что деполимеризация актина цитоскелета приводит к уменьшению тока через каналы глутаматных NMDA-рецепторов (Rosenmund, Westbrook, 1993). С другой стороны, известно, что активация ионотропных глутаматных рецепторов приводит к стабилизации актиновой сети в дендритных шипиках (Fisher et al., 2000). Одним из основных регуляторов полимеризации/деполимеризации актинового цитоскелета в нейронах является фермент LIMK1. Менг и соавторы (Meng et al., 2004) продемонстрировали, что у нокаутных по гену LIMK1 мышей снижена полимеризация актина в гиппокампе и нарушено формирование памяти.

Исследования проводили на насекомых — медоносной пчеле и дрозофиле — в норме и при дефиците кинуренинов. Кинуренины — эндогенные модуляторы рецепторов глутамата. Ранее нами было показано увеличение чувствительности NMDA-, каинатных и метаботропных рецепторов глутамата у пчел, испытывающих дефицит кинуренинов (Лопатина и др., 2004). Дефицит кинурени-

нов не изменял количества NMDA-рецепторов (Зачевило и др., 2007). Позднее мы обнаружили, что дефицит кинуренинов снижает экспрессию LIMK1 в центральном комплексе мозга пчелы и дрозофилы. При этом содержание фибриллярного актина парадоксально возрастает по всему мозгу. В работе Ю и соавторов (Yu et al., 2004) получены сходные результаты на мышах. Таким образом, имеющиеся данные позволяют предположить, что в ситуации дефицита кинуренинов изменяется ток через ионные каналы глутаматных рецепторов, что приводит к стабилизации актиновой сети по LIMK1-независимым путям. Возможно, к накоплению фибриллярного актина причастны PSD-95, CAMKII и RhoA, что требует дальнейших исследований.

Полученные данные могут способствовать пониманию молекулярно-клеточных механизмов таких нейропатологий, как эпилепсия и начальная фаза шизофрении, для которых характерен дефицит кинуренинов.

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СУДЬБА РЕЦЕПТОРА ЭФР В ХОДЕ ЭНДОЦИТОЗА КОРРЕЛИРУЕТ С ДИНАМИКОЙ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ МИКРОТРУБОЧЕК В КЛЕТКАХ HeLa. © М. В. Злобина, Е. С. Корнилова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Ранее нами было показано, что эндоцитоз рецептора эпидермального фактора роста (ЭФР) сопровождается изменением уровня ацетилирования микротрубочек (МТ) в клетках (Злобина и др., 2010. Цитология, 52 : 466—476). Считается, что ацетилирование характерно для стабильных долгоживущих МТ. Мы предположили, что такие МТ необходимы для слияния поздних эндосом друг с другом либо с лизосомами. В связи с этим задачей работы явилось выяснение того, связана ли динамика ацетилирования МТ с определенными стадиями эндоцитоза. Для этого был использован подход, при котором эндоцитоз рецептора ЭФР стимулировали двумя нативными лигандами с различной внутриклеточной судьбой — ЭФР и ТФР α .

Оказалось, что динамика ацетилирования неодинакова при стимуляции эндоцитоза ЭФР и ТФР α . Так, в ходе эндоцитоза, стимулированного ЭФР, рецептор ЭФР деградирует на поздних стадиях в лизосомах, при этом уровень ацетилирования МТ постепенно увеличивается и достигает максимума через 60—90 мин после стимуляции. В то же время другой лиганд, ТФР α , вызывает преимущественное рециклирование рецептора на плазматическую мембрану на ранних стадиях, и такой процесс сопровождается незначительным повышением уровня ацетилирования МТ.

Мы предположили, что сигнал на повышение уровня ацетилирования МТ идет с эндосом определенной степени зрелости. Для того чтобы это проверить, мы попытались переключить путь эндоцитоза, стимулированного ТФР α , с рециклирования на сортировку в поздние эндосомы. Как известно, различия во внутриклеточной судьбе ЭФР и ТФР α связаны с тем, что ТФР α -рецепторные комплексы диссоциируют при внутриэндосомном рН, равном 6,0, тогда как для диссоциации ЭФР-рецепторных комплексов требуются более низкие значения рН. Известно также, что закисление эндосом происходит за счет работы вакуолярной протонной помпы V0/V1, специфическим ингибитором которой является Бафиломицин А1 (Баф А1).

Обнаружено, что в присутствии Баф А1 ЭФР-рецепторные комплексы доставляются в лизосомы, но не под-

вергаются деградации. В случае же ТФР α -рецепторных комплексов действие Баф А1 должно препятствовать их диссоциации, обеспечивая такое же поведение комплексов, как и при действии ЭФР. Действительно, оказалось, что если в контроле рецептор с ТФР α выявляется только в ранних эндосомах, то в присутствии Баф А1 ТФР α -рецепторные комплексы проходят такой же путь, как и ЭФР-рецепторные, и накапливаются в крупных везикулах в околядерной области. При этом уровень ацетилирования после стимуляции эндоцитоза ТФР α повышается до тех же значений, что и при ЭФР-стимулированном эндоцитозе, однако максимум ацетилирования достигается раньше.

Вяснилось, однако, что и сам по себе Баф А1 вызывает значительное увеличение степени ацетилирования тубулина, но она повышается сразу после добавления ингибитора и не изменяется со временем. Это явление требует дальнейших исследований, но можно утверждать, что действие лиганда является приоритетным по сравнению с Баф А1. Известно, что количество ацетилированного тубулина в клетке непосредственно связано с работой гистоновой деацетилазы HDAC6 (Hubbert et al., 2002. Nature, 417 : 455—458). Кроме того, было показано, что активированный рецептор ЭФР способен фосфорилировать HDAC6, тем самым инактивируя ее (Deribe et al., 2009. Science Signaling, 2 (102) : ra84), что приводит к ацетилированию МТ. Мы продемонстрировали, что в случае совместного действия ЭФР или ТФР α с Баф А1 рецептор ЭФР дольше фосфорилирован, чем в отсутствие ингибитора. Это в свою очередь может приводить к более длительной инактивации HDAC6. Наши данные по динамике ацетилирования МТ в ходе эндоцитоза, стимулированного разными лигандами, позволяют предполагать, что сигнал на инактивацию HDAC6 генерируется на поздних стадиях. Таким образом, регуляция динамики ацетилирования МТ в ходе эндоцитоза осуществляется, по-видимому, непосредственно через рецептор ЭФР, локализованный в эндосомах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-01215), Программы МКБ и гранта президента РФ для поддержки ведущих научных школ (НШ-3273.2010.4).

АДАПТОРНЫЙ ПРИНЦИП РЕГУЛЯЦИИ РЕОРГАНИЗАЦИИ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА. © В. П. Иванова,¹ З. В. Ковалева.² ¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН и ² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Полимеризация/деполимеризация актина индуцируется внешними или внутренними сигналами, которые активируют малые ГТФазы (RhoA-H, Rac1-3 и Cdc42). Каждой ГТФазе присуща своя роль в отношении актинового цитоскелета. Так, Rac регулирует образование ламеллиподий через активацию фосфолипидного обмена и образование PIP2, который в свою очередь активирует актин-ассоциированные белки (ААБ) — профилин, кофиллин и гельзолин. Cdc42 активирует WAVE и затем Arp2/3-комплекс, тем самым ускоряя процессы полимеризации актина и образование ламеллиподий и филоподий. Rho регулирует образование стресс-фибрилл и актин-миозиновых пучков.

В процесс полимеризации актина вовлечены три семейства ААБ: N-WASP/Arp2/3, формины и Epa/VASP-белки, имеющие сходное строение. Их С-концевые домены участвуют в связывании и нуклеации актина; центральный, богатый пролином домен взаимодействует с профилином, а N-концевые домены — с различными лигандами. Arp2/3-комплекс создает на уже имеющихся актиновых филаментах Y-образные соединения, формируя точки ветвления актиновой сети, которая стабилизируется кортактином. Arp2/3-комплекс активируется после взаимодействия Arp2-субъединицы с С-концевым участком N-WASP-белка и уже имеющимися в клетке актиновыми филаментами. В результате конформационных изменений комплекса Arp2-субъединица приобретает способность связывать новые молекулы G-актина, образуя боковые филаментозные ответвления. Для активации Arp2/3-комплекса также необходимы присоединение АТФ к Arp3-субъединице комплекса и фосфорилирование Arp2-субъединицы. Представители WASP-семейства включают в себя WASP-белки (WASP и N-WASP) и SCAR/WAVE-белки (SCAR/WAVE1-3). WASP-белки обеспечивают проведение сигналов от малых ГТФаз (Rac и Cdc42), сигнальных адапторов (Grb2 и Nck) и мембранных фосфолипидов (PIP2) через Arp2/3-комплекс на трансформирующуюся актиновую сеть. Arp2/3-комплекс связывается с СА-областью, а мономерный актин — с V-областью С-концевого домена N-WASP-белка. SCAR/WAVE-белки формируют комплекс, состоящий из пяти субъединиц — SCAR/WAVE1-3, Nap1/2, Cyfip1/2 (или PIR121), Abi1-3 и HSPC300. Активация SCAR/WAVE-комплекса осуществляется Rac1 после его связывания с PIR121-субъединицей, после чего комплекс транспортируется из цитоплазмы в ламеллиподию. Установлено, что SCAR/WAVE-белки концентрируются в большом количестве в ведущем крае мигрирующих клеток. Epa/VASP-белки участвуют в клеточных процессах, требующих динамичной перестройки актина (аксональный рост, миграция фибробластов, активация тромбоцитов и Т-клеток), поэтому, как правило, они локализуются в ламеллиподиях, филоподиях и фокальных адгезионных комплексах. Эти белки способствуют нуклеации и полимеризации актина. Общие функции Epa/VASP-белков определяют сходство их строения. N-концевой домен EVH1 взаимодействует с короткими пролинсодержащими модулями адгезионных белков (зиксина и винкулина). Центральный пролин-богатый домен связывается с профилином и белками, содержащими SH3- и WW-модули. В С-концевой области Epa/VASP-белков EVH2-домен содержит места связывания с G- и F-актином, а также участок, способствующий олигомеризации и спирализации F-актина. Полагают, что Epa/VASP-белки поддерживают полимеризацию актина в ведущем крае клетки, препятствуя кэпированию растущих концов F-актина гельзолином. Таким образом, флуктуации в распределении адапторных белковых молекул могут приводить к изменению скорости формирования и реорганизации актиновой сети, а значит, к направленной и регулируемой протрузионной силе.

УЧАСТИЕ БЕЛКОВОГО КОМПЛЕКСА ARP2/3 В РАБОТЕ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ (ENaC). © Д. В. Илатовская,^{1,2} Т. С. Павлов,² В. В. Левченко,² Ю. А. Негуляев,² А. В. Старущенко.² ¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия и ² Медицинский Колледж Висконсина, США.

В физиологии почки и клинической практике продолжает оставаться актуальным вопрос о регуляции реабсорбции натрия. Концентрация Na^+ в плазме определяет объем крови и, следовательно, ее давление. Нарушение регуляции транспорта Na^+ через эпителиальные натриевые каналы (ENaC) приводит к различным патологическим состояниям; в целом повышенная активность ENaC вызывает гипертонию, а пониженная — гипотонию. Таким образом, исследование сигнальных механизмов регуляции ENaC имеет прямое отношение к патофизиологии сердечно-сосудистых и почечных заболеваний.

Элементы цитоскелета вовлечены в регуляцию ионного транспорта в эпителиальных клетках различных органов. Известно, что состояние актиновых микрофиламентов в клетке влияет как на вероятность открытого состояния ENaC, так и на эффективность транспорта канального белка к плазматической мембране. Представленная работа посвящена аспектам актинзависимой регуляции ENaC.

Одним из активно исследуемых на сегодняшний день цитоскелетсвязывающих белков является кортактин, участвующий в различных клеточных процессах, таких как организация актиновых микрофиламентов, эндоцитоз, сборка межклеточных контактов и миграция клеток. В нашем исследовании продемонстрировано, что актинсвязывающий белок кортактин экспрессируется в тканях и клеточных линиях, в которых наблюдается высокий уровень экспрессии ENaC. В частности, он локализуется в клетках собирательных трубочек почки крысы. Проведенные электрофизиологические эксперименты впервые показали, что совместная экспрессия кортактина и ENaC приводит к значительному снижению интегрального ENaC-опосредованного тока в трансфицированных клетках CHO.

Для изучения роли кортактина в регуляции транспорта Na^+ нами была создана клеточная линия trkCCD_{c14} со сниженной экспрессией кортактина. В данной клеточной линии наблюдаются увеличение активности ENaC и повышение реабсорбции натрия по сравнению с контрольными клетками. На основе анализа активности одиночных каналов, а также проведенных экспериментов по мечению белков плазматической мембраны сделан вывод о том, что механизм действия кортактина на ENaC заключается во влиянии на вероятность нахождения канала в открытом состоянии. Результаты коиммунопреципитационных экспериментов, проведенных с нативными и культивируемыми клетками, позволили сделать вывод о том, что субъединицы ENaC и кортактин формируют единый белковый комплекс.

Эксперименты с различными мутантными формами кортактина в трансфицированных клетках CHO показали, что только мутант W22A, не способный связываться с комплексом Arp2/3, не снижает активность ENaC.

Таким образом, комплекс Arp2/3 непосредственно вовлечен в механизм регуляции ENaC кортактином. Более того, ингибитор комплекса Arp2/3 СК-0944666 предотвращает действие кортактина на ENaC. В результате деполимеризации актиновых филаментов и ингибирования комплекса Arp2/3 не происходит потери ассоциации между ENaC и кортактином. Полученные результаты впервые показали, что ENaC регулируется кортактином и что в это функциональное взаимодействие вовлечен комплекс Arp2/3.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (про-

ект 10-04-00995а) и программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ pCofilin, Pcreb И АМИЛОИДНЫХ ВКЛЮЧЕНИЙ В ОБЛАСТИ НЕЙРОМЫШЕЧНЫХ КОНТАКТОВ У МУТАНТНОЙ ЛИНИИ *agn^{ts3} Drosophila melanogaster*. © А. Н. Каминская,^{1,2} А. В. Медведева,¹ Е. В. Савватеева-Попова.¹ ¹Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН и ²Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург.

В настоящее время нейродегенеративные заболевания относят к болезням цитоскелета — кофилинопатиям. Это утверждение основано на том, что гиперактивация кофилина сопровождается образованием кофилин-актиновых комплексов, которые сосредотачиваются вокруг амилоидных включений. Эти комплексы накапливаются в нейронах, тем самым нарушают везикулярный транспорт, что наблюдается на ранних стадиях деменции. Основным регулятором активации/инактивации кофилина является LIMK1. Данный фермент участвует в ремоделировании актина в нейронах, фосфорилируя кофилин, блокирует деполимеризацию актина, что вызывает перестройку шипиков дендритов и модификацию аксонов, обеспечивая этим синаптическую пластичность. Кроме того, LIMK1 транспортируется в ядро, где фосфорилирует транскрипционный фактор CREB, тем самым вызывая активацию CREB-зависимых промоторов генов, принимающих участие в формировании долгосрочной памяти. Низкий базальный уровень pCREB в ядрах нестимулированных нейронов увеличивается за счет поступления CREB из аксонов, что приводит к повышению pCREB-зависимой транскрипции. Поэтому анализ мутантной линии *agn^{ts3}*, затрагивающей регуляторную и структурную части гена *limk1*, позволит определить вклад мутации в характер распределения pCofilin и pCREB, а также в формирование амилоидных включений в области нервно-мышечных контактов II дорсального нерва мезоторакального сегмента имаго *Drosophila*. Методом иммуногистохимической детекции антител к pCofilin и к pCREB с последующей визуализацией с помощью конфокального микроскопа была проведена оценка распределения pCofilin и pCREB в области нервно-мышечных контактов мезоторакального сегмента имаго *Drosophila*. У мутантной линии *agn^{ts3}*, как и в линиях дикого типа (*CS*, *Oregon* и *Berlin*), pCofilin был локализован главным образом в постсинаптической области и вдоль отростков аксонов, предположительно в глиальных клетках, а также в ядрах мышечных клеток. В то же время pCREB во всех анализируемых линиях был выявлен преимущественно в области тонких отростков аксонов, а также в области поперечных перемычек между аксонами. С использованием флуоресцентного красителя Thioflavin S был проведен анализ распределения амилоидных включений в области нейромышечных контактов мезоторакального сегмента имаго *Drosophila*. В результате было выявлено наличие амилоидных включений в зоне тонких отростков аксонов, образующих поперечные перемычки у самцов линии *agn^{ts3}*. У самцов линий *CS*, *Oregon* и *Berlin* амилоидные включения также встречались, но с меньшей частотой по сравнению с *agn^{ts3}* и с локализацией главным образом в области самих аксонов. После действия теплового шока количество включений сокращалось у самцов линии *agn^{ts3}* до уровня дикого типа.

Таким образом, pCREB в области нервно-мышечных окончаний был детектирован в цитоплазме нейронов, в области поперечных перемычек между аксонами, а pCofilin — в области постсинапса. У мутантной линии *agn^{ts3}* наличие амилоидных включений детектируется в области поперечных перемычек между аксонами, что, по-видимому, затрудняет синхронизацию работы мышечных волокон, необходимую для нормальной звукопродукции при уходе за потомством, и сопровождается нарушением обучения и формирования памяти самцов линии *agn^{ts3}*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-01208), проекта ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 гг., программы РАН «Биологическое разнообразие» и Госконтракта с Минобрнауки № ПЗ16.

MAP-КИНАЗА p38 УЧАСТВУЕТ В СТИМУЛЯЦИИ АПОПТОЗА КЛЕТОК КАРЦИНОМ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА. © П. Ю. Козюлина, П. С. Грудинкин, Н. Н. Никольский. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Эпидермальный фактор роста (EGF) в норме является стимулятором пролиферации и выживания клеток. Однако в некоторых клеточных линиях, происходящих из карцином с повышенным уровнем экспрессии рецептора EGF (например, A431 и MDA-MB-468), EGF способен вызывать апоптоз. Ранее была показана определяющая роль транскрипционного фактора STAT1 в этом процессе.

В настоящей работе мы исследовали роль MAP-киназы p38 в EGF-индуцируемом апоптозе клеток карцином. Мы показали, что в клетках эпидермоидной карциномы A431 при действии EGF наблюдаются две волны активации MAP-киназы p38 — на коротких сроках (10 мин) и около 24 ч. Методом МТТ, который показывает суммарную митохондриальную активность клеток, мы установили, что блокирование активности MAP-киназы p38 в клетках A431 малым ингибитором SB203580, а также структурно далеким от него ингибитором BIRB0796 приводило к снижению интенсивности гибели клеток и стабилизации численности популяции. Аналогичные данные были получены и для клеток MDA-MB-468. Ингибирование MAP-киназы p38 приводило также к частичному восстановлению морфологии клеток, подверженных действию EGF. Анализ морфологии ядер при окраске ДНК клеток реагентом DAPI показал, что доля клеток с характерными признаками апоптоза (сильная конденсация хроматина и фрагментация ядра) значительно уменьшалась при ингибировании MAP-киназы p38 в клетках A431 при действии EGF. При помощи иммуноблоттинга мы показали, что ингибирование MAP-киназы p38 приводило к снижению содержания активной (расщепленной) каспазы 3 в подвергшихся воздействию EGF клетках. Таким образом, MAP-киназа p38 участвует в стимуляции апоптоза клеток карцином при действии EGF.

В рамках исследования механизма индукции апоптоза мы проверили предположение о связи MAP-киназы p38 и транскрипционного фактора STAT1 в проведении проапоптотического сигнала при действии EGF. Мы показали, что в клетках A431 при действии EGF ингибирование MAP-киназы p38 не влияет на фосфорилирование STAT1 по серину, однако фосфорилирование STAT1 по

тироzinу (Tyr701) уже на 10 мин воздействия заметно снижается. Хотя серин-треонинoвая киназа p38 не может сама фосфорилировать STAT1 по тирозину, этот результат свидетельствует о ее роли в активации STAT1 при действии EGF.

Исследование выполнено при финансовой поддержке программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», гранта президента РФ для поддержки ведущих научных школ (НШ-3273.2010.4) и включает себя работы в рамках Госконтракта № 02.740.11.0094.

ПРОТЕОМНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РЕАКЦИИ НЕРВНОЙ ТКАНИ РЕЧНОГО РАКА НА ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ. © М. С. Колосов, М. Ю. Бибов, С. В. Демьяненко, В. Д. Ковалева, А. Б. Узденский. Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону.

Фотодинамическая терапия, мощный индуктор окислительного стресса, применяется в онкологии для разрушения опухолевых клеток, в частности для лечения опухолей мозга. Для изучения механизмов фотодинамического повреждения нервной ткани мы исследовали изменения экспрессии 224 белков в брюшной нервной цепочке речного рака (БНЦ), взятой в качестве модельного нейроглиального препарата, с помощью протеомных микрочипов Panorama Ab Cell Signalling Microarray (Sigma).

Фотодинамическое воздействие алюмофталоцианина Фотосенс (1 мкМ, 670 нм, 50 Дж/см²) вызывало некроз 37 % глиальных клеток межганглионарных коннектив. При этом существенно повышался уровень белка Bcl-x_L и снижался уровень каспазы 9, что отражало активацию противоапоптозных механизмов в глиальных клетках, преобладающих в БНЦ. Об этом свидетельствовало и то, что преобладающим типом гибели глиальных клеток был не апоптоз, а некроз. Об изменениях межклеточных взаимодействий свидетельствовало снижение уровня дистрофина, который образует платформу для связывания актинового цитоскелета с интегринами, рецепторами адгезионных взаимодействий клеток с внеклеточным матриксом. На активацию сигнальных путей, связанных с фокальной адгезией, указывали фосфорилирование и соответственно активация протеинкиназы FAK. Одновременно наблюдались повышение уровня протеинкиназы C γ , контролирующей разнообразные клеточные процессы, и фосфорилирование (активация) белка Raf, компонента сигнального пути Ras/Raf/MEK/ERK, регулирующего пролиферацию глиальных клеток. Снижение экспрессии белка p57, ингибитора циклинзависимых киназ, которые инициируют переход G₁/S клеточного цикла, и одновременное повышение уровня белка Cdc27, управляющего переходом G₂/M, могли способствовать пролиферации глиальных клеток. Снижение уровня ацетилированных форм гистона H3 свидетельствовало о декомпактизации хроматина и последующей активации ядерных синтезов. Снижение уровня фосфорилированных форм треонинов могло указывать на участие треонинoвых фосфатаз в реакции нервной ткани на фотодинамическое воздействие.

Таким образом, фотодинамическое воздействие активировало противоапоптозные механизмы, влияло на адгезионные межклеточные взаимодействия и связанные с ними сигнальные процессы, а также на пролиферацию глиальных клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 08-04-01322 и 11-04-01476), гранта Минобрнауки РФ (16.740.11.0368) и гранта президента РФ для поддержки молодых российских ученых (МК-6042.2010.4).

АНАЛИЗ МОНОНУКЛЕАРОВ IN VITRO ДЛЯ ОЦЕНКИ ЧАСТОТЫ НАРУШЕНИЙ МОРФОЛОГИИ КЛЕТОЧНОГО ЯДРА. © Г. П. Косякова,¹ С. Н. Прошин,² П. Д. Шабанов,² А. Ф. Яковлев.¹ ¹ Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения с.-х. животных, Санкт-Петербург—Пушкин, и ² Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург, galkos1@mail.ru.

Целью исследования на данном этапе было изучение спонтанного изменения генетического гомеостаза клеток с применением цитокинетического блока. При этом внимание уделялось изменению признака «спонтанная частота встречаемости лимфоцитов с микроядрами» (ЧЛМ) в контрольной культуре лимфоцитов *in vitro* и культуре лимфоцитов *in vivo* с цитокинетическим блоком. Для получения ответа на вопрос: какой из методов является более чувствительным для выявления спонтанной нестабильности генома, мы и использовали метод цитокинетического блока, так как цитохалазин В разрушает микротрубочки клеток. Частоту встречаемости микроядер в крови быков черно-пестрой породы *in vivo* и *in vitro* определяли с использованием цитохалазина В. Из полученных результатов видно, что в контрольной культуре лимфоцитов от быков отсутствовали двуядерные или многоядерные клетки, частота мононуклеаров (лимфоцитов с одним ядром округлой формы) варьировала от 0 до 7.6 %. В опытной культуре лимфоцитов только у одного быка выявлены микроядра в мононуклеарных клетках. Тогда как в бинуклеированных (двуядерных) лимфоцитах из 48-часовой культуры лимфоцитов микроядра обнаружены у трех быков с варьированием частоты от 0 до 5 %. В среднем в контрольной культуре лимфоцитов спонтанная частота клеток с микроядрами была выше, чем в опытной культуре одноядерных лимфоцитов, на 2.18 % и двуядерных — на 0.3 % соответственно. Частоту встречаемости микроядер в крови телок черно-пестрой породы *in vivo* и *in vitro* также определяли с использованием цитохалазина В. В контрольной и опытных культурах лимфоцитов телок микроядра выявлены и в мононуклеарных, и в бинуклеированных клетках. Различия достоверны ($P < 0.05$) между контрольной популяцией мононуклеарных и опытной бинуклеированных лимфоцитов. В контрольной культуре спонтанная частота лимфоцитов с микроядрами (ЧЛМ) варьировала от 7 до 19 %, а в опытной культуре — от 5 до 25 %. Частота бинуклеированных лимфоцитов с микроядрами изменялась от 4 до 44 %. Необходимо отметить, что у телок значение показателя ЧЛМ в опыте превышает таковое в контроле на 4.4 %. Последнее указывает на высокую чувствительность метода выявления микроядер с использованием цитокинетического блока. Интересно отметить, что исследованная выборка крупного рогатого скота черно-пестрой породы имеет значительную вариабельность признака «спонтанная частота лимфоцитов с микроядрами». Достоверные различия по частоте клеток с микроядрами были выявлены у телок между контрольной популяцией мононуклеарных и опытной бинуклеированных лимфоцитов с цитоки-

нетическим блоком с использованием *U*-критерия Уилкоксона—Манна—Уитни ($P < 0.05$). Действительно, литературные данные показывают, что метод цитокинетического блока позволяет исключить недостатки моонуклеарного метода определения микроядер и, следовательно более чувствителен. При сравнении частот клеток с микроядрами наблюдаются достоверные различия между полами при высоком уровне значимости ($P < 0.01$). Средняя частота микроядер в лимфоцитах телок выше, чем у быков, что может отражать гендерные различия по нестабильности генома крупного рогатого скота, т. е. более высокая частота микроядер у самок могла быть обусловлена гормональным фактором. Таким образом, метод цитокинетического блока *in vitro* более чувствителен для выявления «скрытой» нестабильности генома в сравнении с микроядерным анализом *in vivo*.

РОЛЬ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА В РАБОТЕ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ ВАКУОЛИ У ИНФУЗОРИИ *PARAMECIUM CAUDATUM*. © В. В. Кошеверова, К. А. Бенкен, Е. В. Сабанеева. Кафедра цитологии и гистологии С.-Петербургского государственного университета, saban@mail333.com.

Сократительная вакуоль является одной из специализированных органелл клетки протистов, которая осуществляет осморегуляторную функцию. У инфузории *Paramecium caudatum* сократительная вакуоль образована резервуаром, фактически представляющим собой экзоцитозный пузырек, и окружающими ее приводящими радиальными каналами. В составе приводящих каналов различают ампулу, собственно канал, отходящий от него гладкий спонгиом и декорированный спонгиом, каналыцы которого слепо заканчиваются в цитоплазме. Резервуар сократительной вакуоли соединен с плазматической мембраной с помощью экскреторной поры. Комплекс сократительной вакуоли поддерживается лентами микротрубочек. Пульсация сократительной вакуоли обеспечивается за счет медленного наполнения резервуара жидкостью (диастола) и периодического опорожнения (систола).

Несмотря на то что морфология сократительной вакуоли изучена достаточно хорошо, механизм ее работы остается загадкой. Многочисленные попытки обнаружить филаменты актина, связанные с мембранами сократительной вакуоли, с помощью родамин-фаллоидина до сих пор были безуспешны. Актин был выявлен только в области поры.

В результате подбора особых способов фиксации нам удалось продемонстрировать наличие актина на мембранах элементов сократительной вакуоли у *P. caudatum* с помощью метода иммуноцитохимии с использованием антител к актину 1-1 инфузории *P. aurelia* и обработки клеток флуоресцентно меченым фаллоидином. Интересно, что антитела к актину связывались как с мембраной приводящих каналов, так и с мембраной резервуара, тогда как TRITC-фаллоидин был ассоциирован с порой сократительной вакуоли, мембранами приводящих каналов и спонгиомов, но не с резервуаром. Обработка живых клеток лектином WGA приводила к ингибированию работы сократительной вакуоли на стадии диастолы, которое сопровождалось полным исчезновением приводящих каналов. Этот феномен был использован нами для проверки ранее высказанной в литературе гипотезы относительно индукции сборки цитоскелета мембраной сократительной

вакуоли, испытывающей натяжение. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что натяжение мембраны при наполнении резервуара жидкостью не способствует полимеризации актиновых филаментов, которые укрепляли бы мембрану, как предполагалось ранее, а, наоборот, полностью исключает их наличие. Фибриллярный актин, по-видимому, принимает участие только в работе приводящих каналов сократительной вакуоли.

ВОЗДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДОВ ИНСУЛИНОВОГО СЕМЕЙСТВА И ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА НА АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНУЮ СИГНАЛЬНУЮ СИСТЕМУ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ И МОЗГА КОНТРОЛЬНЫХ И ДИАБЕТИЧЕСКИХ КРЫС. © Л. А. Кузнецова, С. А. Плеснева, Т. С. Шарова, М. Н. Перцева. Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург.

Исследовано действие пептидов инсулиновой природы и ЭФР на аденилатциклазную сигнальную систему (АЦСС) в мышечной и нервной тканях крыс.

Активность аденилатциклазы (АЦ) увеличивается при влиянии пептидных гормонов инсулиновой природы (инсулин и релаксин) и факторов роста (ИФР-1 и ЭФР), действующих отдельно в мембранах скелетных мышц и мозга. При совместном действии инсулина и релаксина обнаруживается аддитивность эффектов этих гормонов на АЦСС в мембранах скелетных мышц крыс, что может свидетельствовать об отсутствии конкуренции между этими двумя аденилатциклазными сигнальными каскадами. В то же время совместное действие факторов роста в концентрации 10^{-9} М приводит к усилению эффектов этих ростовых факторов. При увеличении концентрации одного из пептидов отсутствуют и потенцирование, и аддитивность их эффектов. Таким образом, влияние ростовых факторов при оптимальной концентрации увеличивает стимуляцию АЦСС, а при повышении концентрации пептидов эффект ослабевает, что может указывать на конкуренцию между АЦСС действия ИФР-1 и ЭФР в скелетных мышцах крыс.

В мембранах мозга контрольных крыс совместное влияние инсулина и релаксина приводит к отсутствию АЦ-стимулирующих влияний гормонов, что может указывать на возможные конкурентные отношения между АЦСС действия инсулина и релаксина в отличие от скелетных мышц. Совместное влияние ИФР-1 и ЭФР на АЦСС приводит не только к отсутствию стимуляции, но и к подавлению активности фермента в мембранах мозга контрольных крыс, что может указывать на трансрегуляцию (ингибирование) АЦСС, оцениваемой по изменению функциональной активности АЦ в присутствии двух ростовых факторов — ИФР-1 и ЭФР.

Таким образом, сравнение одновременного действия пептидов на АЦСС в скелетных мышцах и мозге нормальных крыс выявляет тканеспецифичность их действий при стимуляции АЦСС.

Диабетоподобное состояние (модель неонатального 5-суточного стрептозотоцинового диабета 2-го типа) в скелетных мышцах и мозге крыс сопровождается значительной потерей АЦ-стимулирующих эффектов гормонов, действующих отдельно. При сочетанном действии инсулина и релаксина или ИФР-1 и ЭФР также обнаруживается ослабление стимуляции АЦСС в мембранах скелетных мышц. В мозге крыс при сочетанном действии ин-

сулина и релаксина или ИФР-1 и ЭФР АЦ-стимулирующее влияние еще более резко падает. Негативное взаимодействие между АЦСС инсулина и релаксина, ИФР-1 и ЭФР, выявленное в мозговой ткани контрольных животных, еще более выражено при диабете на фоне снижения влияния гормонов.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что при экспериментальном диабете в тканях крыс нарушаются проводящие сигнал функции АЦСС действия пептидов инсулиновой природы и ЭФР.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-01052) и программы «Фундаментальные науки — медицине» (2011 г.).

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА МОЛИКСАН НА ПРОЦЕССЫ Ca^{2+} -СИГНАЛИЗАЦИИ В МАКРОФАГАХ. © Л. С. Курилова, З. И. Крутецкая, О. Е. Лебедев, Н. И. Крутецкая, В. Г. Антонов. С.-Петербургский государственный университет.

Лекарственные препараты глутоксим и моликсан являются представителями нового класса лекарственных веществ тиопозитиков, обладающих иммуномодулирующим, гепатопротективным и гемопозитическим действием на клетки. Глутоксим представляет собой динатриевую соль окисленного глутатиона, GSSG, с платиной в наноконцентрации. Моликсан — комплекс глутоксима и нуклеозида инозина. Ранее нами впервые показано, что GSSG и глутоксим, а также нуклеозиды инозин и гуанозин вызывают двухфазное увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$), связанное с мобилизацией Ca^{2+} из тапсигаргин-чувствительных Ca^{2+} -депо и последующим независимым входом Ca^{2+} из наружной среды в перитонеальных макрофагах крысы. Однако аддитивности в действии агентов при совместном применении выявлено не было. Кроме того, нами было впервые установлено, что ключевыми компонентами сигнального каскада, запускаемого GSSG и глутоксимом и приводящего к увеличению $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах, являются тирозинкиназы, тирозинфосфатазы, фосфатидилинозитолкиназы, фосфолипаза С, протеинкиназа С и элементы актинового цитоскелета. В связи с этим представлялось целесообразным исследовать также влияние моликсана, представляющего собой комплекс глутоксима и инозина, на $[Ca^{2+}]_i$ и изучить механизмы его влияния на процессы Ca^{2+} -сигнализации в перитонеальных макрофагах крысы.

С использованием флуоресцентного Ca^{2+} -зонда Fura-2AM показано, что инкубация макрофагов (25—30 мин) со 100 мкг/мл моликсана в бескальциевой среде вызывает увеличение $[Ca^{2+}]_i$, связанное с мобилизацией Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Последующее введение в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} индуцирует вход Ca^{2+} , обусловленный, по-видимому, опустошением Ca^{2+} -депо. Показано также, что предварительная инкубация клеток со 100 мкг/мл моликсана в течение 30 мин до введения пуринаргического агониста АТФ вызывает значительное (на 50 %) уменьшение фазы мобилизации Ca^{2+} из депо, индуцированной АТФ, что подтверждает тот факт, что увеличение $[Ca^{2+}]_i$, вызываемое моликсаном, обусловлено мобилизацией Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо. Эффект моликсана на $[Ca^{2+}]_i$ на 10—20 % превосходит таковой для глутоксима или инозина, что свидетельствует о

том, что при использовании этих веществ в составе одного препарата наблюдается аддитивность их влияния на $[Ca^{2+}]_i$.

Показано также, что предварительная инкубация макрофагов со 100 мкМ ингибитора тирозинкиназ генистейна в течение 5 мин до введения 100 мкг/мл моликсана вызывает практически полное подавление обеих фаз Ca^{2+} -ответа, индуцированного моликсаном, что свидетельствует об участии тирозинкиназы во влиянии моликсана на $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах. Кроме того, введение 100 мкМ генистейна на фоне развившегося входа Ca^{2+} , индуцированного моликсаном, вызывает быстрое подавление входа Ca^{2+} и возвращение $[Ca^{2+}]_i$ к базальному уровню. Установлено также, что предварительная инкубация клеток со 100 нМ каликулина А, вызывающего образование плотной сети актиновых филаментов под плазмалеммой, в течение 2 мин до введения 100 мкг/мл моликсана вызывает полное подавление обеих фаз Ca^{2+} -ответа, индуцированного моликсаном в макрофагах.

Результаты согласуются с данными, полученными ранее для глутоксима, и позволяют предположить, что моликсан вызывает трансактивацию рецепторов с собственной тирозинкиназной активностью и запускает сигнальный каскад, включающий участие элементов актинового цитоскелета и приводящий к увеличению $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах.

РЕОРГАНИЗАЦИЯ ЦИТОСКЕЛЕТА И ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИЕ МЕМБРАННЫХ ОРГАНЕЛЛ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ МАКРОФАГАЛЬНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ЛИНИИ ТНР-1. © А. В. Курьина, М. В. Ерохина, Е. А. Александрова, Г. Е. Онищенко. Кафедра клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова.

В настоящее время модель дифференцировки клеток линии ТНР-1 широко используется в изучении разнообразных процессов с участием макрофагов. При индукции макрофагальной дифференцировки форболовым эфиром в культуре ТНР-1 наблюдаются изменения как биохимических, так и функциональных параметров клеток. Данные изменения в состоянии клеток сопровождаются реорганизацией цитоскелета и мембранных органелл в цитоплазме. Остается открытым вопрос о динамике изменений в распределении элементов цитоскелета и мембранных органелл на разных этапах макрофагальной дифференцировки. Цель нашей работы — выделение этапов макрофагальной дифференцировки, исследование реорганизации элементов цитоскелета и распределения мембранных органелл при действии форболового эфира на клетки линии ТНР-1. При индукции дифференцировки форболовым эфиром в концентрации 10^{-7} М клетки прикрепляются к подложке, далее наблюдается остановка пролиферации, а на заключительном этапе происходит гибель клеток по механизму апоптоза. При исследовании морфологии клеток обнаружены разные варианты клеток: а) моноцитоподобные (ошаренные клетки), б) веретеновидные (распластанные клетки, преимущественно с двумя длинными отростками) и в) макрофагоподобные (распластанные клетки с многочисленными отростками). На ранних этапах дифференцировки (1—3-и сут) преобладают моноцитоподобные клетки. В дальнейшем (5—7-е сут) наблюдается увеличение числа макрофагоподобных и веретеновидных клеток. В таких распластанных

клетках появляются многочисленные пучки актиновых микрофиламентов. Одновременно происходит реорганизация микротрубочек: в макрофагоподобных клетках формируется развитая радиальная сеть микротрубочек, а в веретеновидных клетках микротрубочки выстраиваются в длинные пучки, идущие на периферию клеток в отростки. Наряду с элементами цитоскелета происходят изменения в локализации митохондрий и аппарата Гольджи. На 1—3-и сут появляются разнообразные по форме митохондрии. В моноцитоподобных клетках зернистые митохондрии распределяются равномерно по всей цитоплазме или аккумулируются в окооядерной области. В распластанных клетках митохондрии разной формы — от мелких зернистых до длинных нитчатых — распределены по цитоплазме. В клетках с длинными отростками происходит выстраивание митохондрий вдоль пучков микротрубочек. На более поздних сроках митохондрии перемещаются из отростков в тело клетки к ядру и образуют скопление вокруг клеточного центра. Цистерны аппарата Гольджи собраны компактно в форме лучевой звезды в моноцитоподобных клетках. При дифференцировке уже на 3-и сут в распластанных клетках наблюдается увеличение числа цистерн аппарата Гольджи, которые локализуются преимущественно вокруг ядра. Также происходят изменения в распределении везикул кислого компартмента в цитоплазме клеток. На 1—3-и сут в моноцитоподобных клетках лизосомы локализуются преимущественно вокруг клеточного центра, на 5—7-е сут в распластанных макрофагоподобных и веретеновидных клетках они распределены по всей цитоплазме. Таким образом, при действии форболового эфира в культуре ТНР-1 образуется три морфологических типа клеток — моноцитоподобные, макрофагоподобные и веретеновидные. Специфическое для этих клеток расположение элементов цитоскелета и распределение мембранных органелл может служить морфофункциональным критерием для характеристики клеток, вступающих в макрофагальную дифференцировку.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 11-04-01518-а).

МЕХАНИЗМЫ НАКОПЛЕНИЯ БЕЛКОВ В ЯДРЫШКЕ ЗА СЧЕТ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ СИГНАЛОВ ЯДРЫШКОВОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ. © Я. Р. Мусинова, О. М. Лисицына, Е. Ю. Кананыхина, В. Ю. Поляков, Е. В. Шеваль. НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ им. М. В. Ломоносова.

Интерфазное ядро содержит множество обособленных структурных доменов, каждый из которых характеризуется специфическим набором белков. Большая часть известных белков не связана с доменами стабильно, а постоянно обменивается с пулом белка в нуклеоплазме. В составе структур концентрация белка может многократно превышать концентрацию белка в нуклеоплазме, но никаких экспериментальных подтверждений существования систем направленного транспорта ядерных белков не представлено. Основной механизм накопления, по-видимому, сопряжен с повышенной константой связывания подвижных белков внутри специфических доменов. В данной работе проведено исследование одного из механизмов накопления белков в ядрышке — динамического удержания белков за счет сигналов ядрышковой

локализации (NoLS). Большинство таких сигналов перекрывается с предсказываемыми сигналами ядерной локализации, и экспериментальные данные косвенно свидетельствуют о том, что данная функция является первичной. Биоинформатический анализ показал, что данный класс сигналов довольно гетерогенен по структуре. Мы проанализировали характеристики обогащенных аргинином сигналов, которые характерны для белков животных. Для работы мы использовали панель искусственных NoLS, слитых с EGFP. Показано, что сигналы такого рода могут приводить к неспецифическому накоплению неядрышковых белков внутри ядрышек, что, как показал анализ методом FRAP, связано с большим временем удержания белка внутри структуры. Эффективность накопления коррелирует с зарядом сигнала, т. е. способ реализации функции, по-видимому, электростатический. Были проанализированы возможные компоненты, с которыми взаимодействуют сигналы ядрышковой локализации. В литературе высказывалось предположение о том, что такие сигналы взаимодействуют с мажорным белком ядрышка B23. Анализ с использованием метода бимолекулярной флуоресцентной комплементации и с использованием перемещенных в нуклеоплазму фрагментов B23 не подтверждает данного предположения. Имеющиеся экспериментальные данные свидетельствуют в пользу того, что функция NoLS реализуется путем связывания с РНК. Таким образом, NoLS обеспечивает неспецифическое накопление подвижных белков в условиях отсутствия направленного транспорта в ядрышко за счет электростатического взаимодействия с РНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-01430) и гранта президента РФ (проект МК-1332.2010.4).

СЛИЯНИЕ ЦИТОПЛАСТОВ И КАРИОПЛАСТОВ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НЕЙРОНОВ. © О. С. Сотников, А. А. Лактионова, Н. М. Парамонова. Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург.

Объединение цитопластов и кариопластов клеток различных тканевых типов осуществлено многократно и убедительно. Эта методика широко используется для выяснения ядерно-цитоплазматических отношений в цитологических исследованиях, сформировалось представление о реконструированных клетках. Не вызывает сомнения, что механизмом морфогенеза в этих случаях является синцитиальное слияние фрагментов клеток. Но в этих исследованиях есть одно исключение. Отсутствуют подобные опыты с нейронами. Общепризнанная нейронная теория в категорической форме отрицает возможность синцитиальной связи между нейронами, а следовательно, и возможность их слияния. В качестве механизма образования двуядерных и многоядерных нейронов рассматривается только amitotическое деление.

В наших предыдущих ультраструктурных исследованиях во многих отделах нервной системы обнаружены цитоплазматические синцитиальные поры и крупные перфорации, сформированные на основе щелевых контактов. Поэтому нами было высказано предположение о возможности синцитиального слияния нейронов между собой и с цитопластами и кариопластами, так же как и у клеток других типов в эксперименте.

В наших исследованиях нейроны моллюска *Lymnaea stagnalis* изолировали из ганглия с помощью протеолитической обработки и после центрифугирования сливали их в культуральную среду. Для энуклеации клетки помещали в культуральную среду с цитохалазином В, после чего проводили многократное пипетирование для окончательного отделения кариопластов от цитопластов. Затем к этим фрагментам добавляли свежеприготовленные нервные клетки с целью добиться слияния цитопластов с живыми нейронами. Для этого осуществляли центрифугирование полученных фрагментов нейронов с целыми нейронами и сохраняли агрегаты в культуральной среде в течение 2 сут. Далее с помощью стандартной трансмиссионной электронной микроскопии исследовали ультраструктуру границ контактирующих нейронов.

В результате этих процедур нами было получено слияние тел нейронов с образованием двуядерных и многоядерных клеток, а в дальнейшем — несколько вариантов слияния цитопластов и кариопластов между собой и с целыми нейронами. Изолированный цитопласт содержит несколько набухшие цистерны эндоплазматического ретикулума. По периферии цитопласта располагаются лизосомы, количество которых существенно увеличено. Матрикс у части цитопластов имеет повышенную электронную плотность. Кариопласты имеют узкий слой нейроплазмы с лизосомами. В ядре расположены агрегаты гетерохроматина. На границах сливающихся цитопластов и кариопластов всегда прослеживаются вакуолеподобные структуры, которые представляют собой резкие локальные расширения межмембранных щелей, подобные тем, что образуются при слиянии тел нейронов. Между вакуолеподобными структурами располагаются множественные узкие и широкие цитоплазматические мостики. Встречаются агрегаты слившихся воедино двух кариопластов или комплексы кариопластов, цитопластов и тел целых нейронов.

Проведенные эксперименты свидетельствуют о том, что нейроны подобно клеткам всех других типов способны к синцитиальному слиянию с образованием двуядерных клеток, к энуклеации с формированием цито- и кариопластов, которые могут сливаться друг с другом или с другими нейронами. Так как ампутированные отростки также являются цитопластами, теоретически можно предположить возможность их слияния с телами других нейронов после ампутации и предотвращения валлеровской дегенерации.

ХАРАКТЕРИСТИКА ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ПУТИ, ВОВЛЕЧЕННОГО В РЕАЛИЗАЦИЮ ИНДУЦИРУЮЩЕГО ВЛИЯНИЯ ПРОЛАКТИНА НА МЕЙОЗ ООЦИТОВ КОРОВ. © И. Ю. Лебедева, Г. Н. Сингина, Т. Е. Тарадайник, А. А. Овчинников. Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства РАСХН, Подольск—Дубровицы.

Гипофизарный гормон пролактин (ПРЛ) является одним из эндокринных регуляторов созревания ооцитов млекопитающих, что согласуется с присутствием лактогенных рецепторов или их мРНК в половых клетках антральных фолликулов у различных видов животных (Pisazo et al., 2004; Kiarekou et al., 2005; Lebedeva et al., 2009). Вместе с тем механизмы проведения сигнала ПРЛ в ооцитах изучены лишь в незначительной степени. При использовании модели *in vitro* культивирования изолированных ооцитов коров ранее нами было показано стимулирующее

влияние ПРЛ на реинициацию мейоза в присутствии цАМФ-повышающих реагентов, которое, очевидно, опосредуется фосфодиэстеразой 3 (Лебедева и др., 2009). Целью настоящей работы являлась идентификация компонентов сигнального пути, индуцированного пролактином в ооцитах и сопряженного с активацией фосфодиэстеразы 3 и последующим снятием блокады мейоза. Ооцит-кумуляные комплексы коров выделяли из фолликулов диаметром 2—8 мм. Для получения денудированных ооцитов (ДО) проводили диссоциацию клеток кумулюса путем обработки соответствующих комплексов коллагеназой II (2 мг/мл) в течение 20 мин при 37 °С. В промывную среду добавляли 0.5 мМ неселективного ингибитора фосфодиэстераз изобутилметилксантина для торможения преждевременного снижения концентрации цАМФ в клетках. Морфологически нормальные ДО культивировали в течение 7 ч в среде ТС-199, содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки (контроль). Среди опытных групп была модифицирована внесением 20 мкМ ингибитора фосфодиэстеразы 3 цилостамида (ЦЛС; Biotol, США) и (или) 50 нг/мл бычьего ПРЛ (20 МЕ/мг; Эндокринологический научный центр РАМН, Москва). В первой серии экспериментов инкубацию ДО проводили в отсутствие или в присутствии 10 мкг/мл неселективного ингибитора тирозинкиназ генистейна (ГНТ; ICN, США). Во второй серии экспериментов в культуральную среду контрольной и опытных групп вносили один из двух аналогов цАМФ: активатор протеинкиназы А 8-Br-cAMP (Sigma, США) или активатор ЕРАС (обменных белков, активируемых цАМФ) 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (Sigma, США). Ооциты фиксировали по методу Тарковского и использовали для цитогенетического анализа состояния ядерного материала. Эксперименты по культивированию ооцитов были выполнены в 4 независимых повторностях. Данные обрабатывали методом двухфакторного дисперсионного анализа. Было установлено, что ЦЛС, селективный ингибитор фосфодиэстеразы 3, повышает в 2 раза относительное число ооцитов, остающихся на стадии диплотены через 7 ч инкубации ДО ($P < 0.001$). Внесение ПРЛ в среду, содержащую ЦЛС, напротив, приводило к уменьшению в 1.4 раза доли ооцитов, не возобновивших мейоз ($P < 0.01$). Этот стимулирующий эффект ПРЛ не зависел от присутствия в среде генистейна, неселективного ингибитора тирозинкиназ. 8-Br-cAMP и 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, активирующие эффекторы цАМФ двух разных типов, в концентрации 100 мкМ тормозили реинициацию мейоза в ооцитах коров ($P < 0.05$), однако их ингибирующее влияние было менее значительным, чем влияние ЦЛС ($P < 0.05$). Оба аналога цАМФ блокировали стимулирующее мейоз действие ПРЛ в присутствии ЦЛС, повышая долю ооцитов на стадии диплотены до таковой в среде с одним ингибитором фосфодиэстеразы 3 ($P < 0.01$). Полученные результаты свидетельствуют о том, что тирозинкиназы не участвуют в опосредовании стимулирующего влияния ПРЛ на активность фосфодиэстеразы 3 в ооцитах коров. Данные также подтверждают концепцию о том, что индуцирующее влияние ПРЛ на реинициацию мейоза реализуется на уровне регуляции взаимодействия цАМФ—фосфодиэстераза 3 и не связано с прямым ингибированием действия эффекторов цАМФ.

ЛОКАЛЬНОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ДОФАМИНОВОГО РЕЦЕПТОРА 1-ГО ТИПА У КРЫС ЛИ-

НИИ WAG/Rij ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СВЯЗИ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ И АБСАНСНОЙ ЭПИЛЕПСИИ. © А. А. Левандовская, А. И. Белоусов, С. В. Саложин. Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва.

Дофамин — нейромедиатор, который принимает участие в различных процессах мозга, например задействован в когнитивных процессах и процессах подкрепления, мотивации, внимания и эмоций, принимает участие в эндокринной регуляции и сне, отвечает за прием пищи, влияет на кратковременную и долговременную память. Из литературных данных известно, что nigrostriарный и мезолимбический дофаминовые пути участвуют в регуляции пик-волновых разрядов, служащих отличительным признаком малых эпилептических припадков (Deransart et al., 2000; de Bruin et al., 2001). Результаты исследований поведения у крыс с малыми эпилептическими припадками, проведенные в нашем институте, указывают на нарушения работы дофаминергической системы у этих животных (Базян и др., 2001). Также было показано, что добавление агонистов дофаминового рецептора 1-го типа (DRD1a) приводит к снижению пик-волновых разрядов. Мы предположили, что локальное изменение количества рецепторов DRD1a будет иметь схожее действие, как и добавление агонистов.

Основная цель этой работы — получение животных с локально увеличенной экспрессией гена дофаминового рецептора 1-го типа. Для получения такого животного нужно ввести суспензию лентивирусов, полученную с использованием конструкции для оверэкспрессии гена DRD1a, в область прилежащего ядра крысам линии WAG/Rij (генетическая модель абсансной эпилепсии). Из клеток мозга крысы выделили тотальную РНК, методом обратной транскрипции получили кДНК с олиго(dT) праймером. С полученной кДНК амплифицировали кодирующую последовательность гена дофаминового рецептора 1-го типа, которую затем клонировали в вектор под нейрональным промотором. Полученную конструкцию мы планируем трансфицировать в клетки линии PC12 для проверки оверэкспрессии методом ПЦР в реальном времени и иммуноблот-анализом. Мы планируем наработать суспензию лентивирусов с использованием конструкции для оверэкспрессии гена DRD1a в клетках линии HEK 293T и инъецировать ее 6-месячным крысам линии WAG/Rij. Работа полученной конструкции *in vivo* будет анализирована методом иммуногистохимии и иммуноблот-анализом. Также в лаборатории получены плазмиды, несущие конструкции для подавления экспрессии гена дофаминового рецептора 1-го типа.

Дофаминовый рецептор 1-го типа сопряжен с G-белками, стимулирует аденилатциклазу. Эти рецепторы запускают широкий спектр внутриклеточных каскадов через активацию сАМР-зависимых киназ. Метод локального увеличения экспрессии генов DRD1a направлен на более детальное понимание роли дофаминергической системы в этиологии абсансной эпилепсии. Крыс с локально увеличенной экспрессией гена дофаминового рецептора 1-го типа можно использовать для дальнейших экспериментов по электрофизиологии и поведению.

РЕГУЛЯЦИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МИТОХОНДРИЙ С ВИМЕНТИНОМ МАЛОЙ ГТФазой Rac1. © Е. А. Матвеева, А. А. Минин. Институт белка РАН, Москва.

Функционирование митохондрий зависит от их внутриклеточного распределения. Правильное распределение митохондрий определяется взаимодействием с такими цитоскелетными структурами, как микротрубочки, актиновые микрофиламенты и промежуточные филаменты. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что виментиновые промежуточные филаменты контролируют не только распределение и подвижность митохондрий, но также и их трансмембранный потенциал и чувствительность к оксидативному стрессу. За эти эффекты виментиновых промежуточных филаментов на митохондриях отвечает N-концевой участок молекулы виментина (с 45-го по 70-й аминокислотный остаток). Этот предполагаемый участок связывания митохондрий с виментином содержит несколько остатков серина, которые являются сайтами фосфорилирования для известных протеинкиназ. Следовательно, N-концевой участок молекулы виментина может являться потенциальным участком регулирования связывания митохондрий с промежуточными филаментами. Одним из этих сайтов является Ser56, который фосфорилируется р21-активируемой киназой-1 (РАК-1). РАК-1 в свою очередь служит эффектором малой ГТФазы Rac1. С другой стороны, ранее мы продемонстрировали, что малая ГТФаза RhoA вовлечена в регуляцию подвижности митохондрий и ее активация приводит к закориванию этих органелл и предотвращает их перемещение. Мы провели эксперименты для определения возможной роли белка Rac1 в регуляции подвижности митохондрий и их связи с промежуточными филаментами. С использованием конститутивно-активного мутанта белка Rac1 мы подтвердили, что этот белок действительно повышает подвижность митохондрий и влияет на их трансмембранный потенциал. Затем мы убедились, что протеинкиназа РАК-1 действительно является эффектором Rac1 и отвечает за влияние Rac1 на митохондриях. Наши данные показывают, что активация Rac1 не вызывает изменения в свойствах митохондрий в присутствии доминантно-негативного мутанта РАК-1 или при наличии точечной замены S56A в молекуле виментина. Таким образом, мы заключаем, что взаимодействие митохондрий с виментиновыми промежуточными филаментами находится под контролем малой ГТФазы Rac1 (и ее эффектора РАК-1), которая модифицирует предполагаемый сайт связывания митохондрий с N-концевым участком молекулы виментина.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-00414-а).

РОЛЬ ВИМЕНТИНОВЫХ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ФИЛАМЕНТОВ В МИГРАЦИИ КЛЕТОК. © А. А. Минин,¹ Е. А. Матвеева,¹ И. С. Черноуваненко.² ¹ Институт белка РАН и ² Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва.

Вопрос о функциях виментиновых промежуточных филаментов (вПФ), одного из трех компонентов цитоскелета, остается загадкой вот уже скоро три десятилетия. С одной стороны, наличие вПФ является характерной особенностью некоторых клеток и тканей в норме и надежным маркером злокачественного перерождения ряда опухолей в патологии. С другой стороны, нокаут гена виментина у мышей не приводит к каким-либо значитель-

ным изменениям, т. е. означает, что развитие и основные физиологические функции млекопитающих не зависят от этого цитоскелетного белка. Необходимо отметить, что у животных, лишенных виментина, были обнаружены различные изменения, связанные, как правило, с нарушением миграции клеток в места повреждений тканей или воспалений. Эти данные вместе с другими, полученными на культурах клеток, лишенных виментина, указывают на возможную роль вПФ в миграции клеток, но механизм такого участия остается неясным.

В настоящем докладе мы предлагаем новые данные, указывающие на взаимодействие вПФ с митохондриями и свидетельствующие о том, что такое взаимодействие регулирует важнейшие функции митохондрий. На основе полученных данных мы предлагаем гипотезу о возможном участии вПФ и митохондрий в определении поляризованного фенотипа мигрирующих клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке РАН, Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 06-04-48452-а и 10-04-00414-а) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

СПОСОБЫ РЕГУЛИРОВАНИЯ АКТИВНОСТИ СИГНАЛЬНЫХ КАСКАДОВ NF-κB И SAPK/JNK ПРИ ОСТРОМ ВОСПАЛЕНИИ У МЫШЕЙ. © Т. В. Новоселова, О. В. Глушкова, М. О. Хренов, С. М. Лушин, С. Б. Парфенюк, Е. Г. Новоселова. Институт биофизики клетки РАН, Пушкино, Московская обл.

Несмотря на достижения современной медицины в борьбе с гнойно-воспалительными заболеваниями, сепсис остается одной из наиболее сложных и недостаточно изученных общемедицинских проблем. В связи с этим была поставлена задача оценить уровни активации каскадов сигнальной трансдукции NF-κB и SAPK/JNK в условиях острого воспаления, вызванного эндотоксином из стенок *Escherichia coli*, и предотвратить развитие процессов активации этих сигнальных каскадов введением гелданамицина или применением предварительной диеты с антиоксидантами для снижения уровня окислительного стресса.

В условиях окислительного стресса эндогенная система защиты клетки, включающая в себя ферменты-антиоксиданты и низкомолекулярные соединения, оказывается не в состоянии в полной мере выполнять свою функцию по нейтрализации избытка АФК. По этой причине экзогенные антиоксиданты оказываются весьма эффективными. Первая часть работы состояла в исследовании эффектов комплекса антиоксидантов (α-токоферол, β-каротин и кофермент Q₉), добавленных в диету, на сигнальные каскады NF-κB и SAPK/JNK в условиях острого воспаления. Для того чтобы выяснить возможные механизмы защитного эффекта антиоксидантов, оценивали активность двух сигнальных каскадов путем измерения фосфорилированных форм этих белков. Результаты показали, что диета предотвращает активацию фосфорилирования NF-κB и киназы IKK (которая обеспечивает фосфорилирование ингибиторных молекул, включая IκB) в клетках мышей, которым вводили ЛПС. Аналогичные эффекты мы наблюдали и в отношении фосфорилированной формы SAPK/JNK. Таким образом, нагрузка антиоксидантами предотвращает чрезмерную активацию исследуемых сигнальных каскадов NF-κB и SAPK/JNK при остром воспалении. Во второй части работы исследовали влияние гел-

данамицина, который является БТШ90-связывающим препаратом, на активность каскадов сигнальной трансдукции NF-κB и SAPK/JNK. Учитывая фармакологическую активность этого антибиотика, необходимо выяснение механизмов его воздействия на ключевые регуляторы защитной системы клетки. Для этого было проведено исследование влияния гелданамицина на продукцию сигнальных белков в нормальных лимфоцитах мышей. Установили, что *in vitro* гелданамицин ингибирует активность этих двух сигнальных каскадов. Введение гелданамицина *in vivo* оказывало такой же ингибирующий эффект на активность каскада NF-κB, о чем свидетельствовало угнетение активности киназы IKK как в нормальных условиях, так особенно заметно при воспалении. Это означает, что гелданамицин предотвращал активацию каскада сигнальной трансдукции NF-κB, вызванную введением эндотоксина. Кроме того, применение антибиотика предотвращало активацию каскада SAPK/JNK, снижая уровень фосфорилирования этой протеинкиназы. Таким образом, мы показали, что как диета с природными антиоксидантами, так и введение антибиотика снижают токсический эффект бактериального агента, при этом противовоспалительный эффект и антиоксидантов, и гелданамицина реализуется через снижение активации сигнальных каскадов NF-κB и SAPK/JNK.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 10-04-00351-а и 11-04-00023-а), программы президиума РАН «Фундаментальные науки—медицине» (2011 г.) и гранта президента РФ по поддержке ведущих научных школ (НШ-3202.2010.4).

РОЛЬ СИГНАЛЬНОГО mTOR-КИНАЗНОГО КАСКАДА В РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ И СТАРЕНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК. © Т. В. Поспелова, Ж. В. Шутикова, В. А. Поспелов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, tvpgroup@mail.ru.

mTOR (*mammalian target of rapamycin*) — высококонсервативная Ser/Thr-киназа — является одним из основных координаторов процессов пролиферации, выживания, метаболизма и клеточного старения. mTOR существует в виде комплексов mTORC1 и mTORC2. В настоящем сообщении будут представлены данные о роли киназных комплексов mTORC1 и mTORC2 в регуляции процесса старения опухолевых клеток, вызванного ингибитором гистоновых деацетилаз (HDACi) бутиратом натрия. Показано, что необратимый блок клеточного цикла, вызванный действием NaB, сопровождается активацией комплекса mTORC1, как следует из данных по накоплению белков-мишеней p-S6K1, белка p-S6, вовлеченного в биогенез рибосом, и ингибитора инициации элонгации 4E-BP1, фосфорилирование которого отменяет его ингибиторные функции. В условиях блока клеточного цикла это приводит к накоплению белка и гипертрофическому росту клеток — характерному маркеру старения. Специфический ингибитор киназного каскада mTORC1 — рапамицин — подавляет гипертрофический рост клеток, отменяет блок клеточного цикла и HDACi-индуцированное старение. Одновременно процесс старения сопровождается активацией комплекса mTORC2, который контролирует апоптоз, полимеризацию актина и аутофагию. Это показано по накоплению фосфорилированного белка-мише-

ни — PKB/Akt-Ser473, по активации Rho-киназного каскада и накоплению фосфорилированного кофилина, приводящего к перестройкам актинового цитоскелета. Используя клетки с нокаутом по гену *p21/Waf1*, было обнаружено, что в отсутствие ингибитора циклинзависимых киназ HDACi-индуцированный блок клеточного цикла является обратимым и не завершается активацией программы старения. Высокая активность комплексов mTOR в процессе старения клеток коррелирует с персистенцией HDACi-индуцированных фокусов гамма-H2AX, присутствие которых может быть связано с изменением структурной организации хроматина при старении клеток. Показано, что полное подавление активности mTORC1 рапамицином приводит к подавлению формирования персистирующих фокусов гамма-H2AX, характерных для стареющих клеток. Полученные данные позволяют говорить о координирующей роли комплексов киназы mTOR в регуляции событий клеточного цикла и процесса старения опухолевых клеток.

ВЛИЯНИЕ Met-РЕЦЕПТОРА НА E-КАДЕРИНЗАВИСИМУЮ МЕЖКЛЕТОЧНУЮ АДГЕЗИЮ. © *В. В. Багаева, Г. Ф. Решетникова.* Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

В настоящее время многочисленные исследования показали, что высокозлокачественные формы рака характеризуются ослаблением межклеточных контактов и усилением подвижности клеток. Важную роль в этом процессе играет Met-рецептор, который запускает уникальную биологическую программу, ведущую к инвазивному росту.

Для исследования механизмов участия Met-рецептора в регуляции E-кадгеринзависимых межклеточных контактов и возможности обратного влияния E-кадгерина на биологические функции рецепторных тирозинкиназ в работе были использованы клеточные линии карцином человека с различным статусом межклеточной адгезии.

Используя как биохимические, так и морфологические подходы, мы показали, что в клетках различных карцином человека внутриклеточная локализация Met-рецептора зависит от функции E-кадгерина. Было установлено, что Met локализуется на мембране в клетках HT-29, обладающих E-кадгеринзависимой адгезией. Наоборот, в клетках, неспособных формировать контакты вследствие дисфункции E-кадгерина или вследствие утраты последнего, Met преимущественно накапливается в цитозоле.

Дальнейший анализ поведения Met-рецептора в клетках HT-29 показал, что накоплению Met на мембране способствует процесс стабилизации межклеточной E-кадгеринзависимой адгезии в клетках HT-29. С помощью конфокальной микроскопии показано, что Met локализуется с E-кадгеринсом в области зрелых межклеточных контактов на латеральной стороне клеток. Использование непроникающего сшивающего агента DTSSP позволило установить, что в интактных клетках HT-29 между экстраклеточными доменами Met и E-кадгерина возможно прямое взаимодействие.

Гепацитарный фактор роста (HGF) является лигандом Met. Стимуляция клеток HT-29 HGF индуцирует перераспределение рецептора и адгезивных белков (кадгерина и катенина) с клеточной мембраны внутрь клеток. В конечном итоге это приводит к «классическому» клеточному ответу — распаду колоний. Наблюдается «центробежная»

миграция клеток из середины колоний наружу. В клетках, стимулированных HGF, обнаруживается копреципитация Met-рецептора, E-кадгерина и бета-катенина. Кроме того, было показано, что статус межклеточной адгезии модулирует длительность активации Erk-киназы при инкубации клеток с HGF. В высокоадгезивных клетках наблюдалось значительное укорочение времени активации Erk по сравнению с E-кадгерин-негативными клетками.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что между Met-рецептором и E-кадгеринсом существует двуполуправленное взаимодействие: не только рецептор влияет на функцию E-кадгерина, но и E-кадгерин определяет поведение рецептора.

НАРУШЕНИЕ РАБОТЫ ДЕПОУПРАВЛЯЕМЫХ Кальциевых КАНАЛОВ В ТРАНСГЕННОЙ МЫШИНОЙ МОДЕЛИ И КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА. © *М. А. Рязанцева, И. А. Поздняков, Л. Н. Глушанкова, Е. В. Казначеева.* Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Нарушение кальциевой сигнализации в нейронах рассматривается как одна из причин развития болезни Альцгеймера. В 40 % случаев наследственной болезни Альцгеймера (НБА) наблюдались мутации в белках пресенилине-1 (PS1) и пресенилине-2 (PS2). Белки пресенилины входят в состав гамма-секретазы, а также работают как каналы утечки Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума (ЭР). Мутация PS1-M146V вызывает потерю функции канала утечки и повышение содержания Ca^{2+} в ЭР. Для мутации PS1-DE9 показаны повышенная проводимость канала утечки и понижение концентрации свободного Ca^{2+} в ЭР.

Было сделано предположение о том, что депоуправляемые кальциевые каналы, активирующиеся в ответ на понижение концентрации свободного Ca^{2+} в ЭР, могут принимать участие в развитии патологии НБА, вызванной мутациями в белках пресенилинах. С помощью метода локальной фиксации потенциала (patch-clamp technique) в конфигурации whole-cell было показано подавление депоуправляемого входа кальция, активированного пассивным опустошением депо с помощью блокатора Ca^{2+} АТ-Фаз SERCA тапсигаргина, в первичной культуре нейронов гиппокампа мышшиной модели НБА (KI-PS1-M146V, Thy1-APPKM670/671NL и Thy1-tauP301L) по сравнению с нейронами WT мышей. Подавляющее влияние мутантного пресенилина PS1-M146V на депоуправляемый вход кальция было подтверждено в экспериментах с трансфицированными клетками нейробластомы SK-N-SH и первичной культурой нейронов гиппокампа крыс. В этих же клетках, трансфицированных мутантом PS1-DE9, наблюдался противоположный эффект на депоуправляемый вход кальция. В качестве контроля клетки трансфицировались PS1-wt. Эффекты мутаций на депоуправляемый вход не зависели от способа активации депоуправляемого входа и повторялись при его активации с помощью тапсигаргина, внутриклеточного хелатирования кальция с BAPTA или увеличения внутриклеточной концентрации IP_3 при действии карбахола. Основной эффект мутантных пресенилинов не был обусловлен изменением уровня экспрессии основных белков, детерминирующих депоуправляемый вход кальция, таких как TRPC1, Orai1, STIM1 и STIM2. Следовательно, причина нарушения работы депоуправляемых кальциевых каналов в мышшиной модели и

клеточной модели НБА заключается в нарушениях работы каналов утечки Ca^{2+} , вызванных мутациями в гене белка пресенилин-1.

Работа выполнена при финансовой поддержке госконтракта № П332, Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-00956) и гранта президента РФ для поддержки ведущих научных школ (НШ-3796.2010.4).

ФАКТОРЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ СТРЕССОВЫХ ГРАНУЛ. © А. А. Саблина,¹ Е. М. Чудинова,² А. А. Шильман, Е. С. Надеждина,² П. А. Иванов.¹

¹ МГУ им. М. В. Ломоносова и ² Институт белка РАН, Пушкино, Московская обл.

Стрессовые гранулы (СГ) — скопления мРНК в цитоплазме животных клеток, наблюдающиеся после воздействия на клетки различных стрессовых факторов и исчезающие после прекращения стрессорного воздействия. В состав СГ входит мРНК, РНК-связывающие белки, некоторые факторы инициации трансляции и 40S рибосомная субъединица. В СГ не включаются 60S рибосомная субъединица, факторы инициации eIF5 и eIF2. Предполагается, что образование СГ является следствием ингибирования трансляции на стадии инициации за счет фосфорилирования α -субъединицы фактора инициации eIF2. В результате такого фосфорилирования в клетке резко снижается количество тройственного комплекса, и на 5-конце мРНК собирается неканонический инициаторный комплекс, не содержащий тройственного комплекса. Вероятно, именно такие инициаторные комплексы и объединяются в цитоплазме в СГ. Мы также ранее показали, что образование стрессовых гранул под воздействием арсената в клетках ингибируется при разрушении микротрубочек нокодазолом. Впоследствии другие авторы показали, что в отсутствие микротрубочек образование СГ происходит при действии арсенита, но образуются гранулы меньшего размера.

Поскольку арсенат является более слабым стрессующим агентом, чем арсенит, возникает ряд вопросов. 1. Определяется ли зависимость образования СГ от микротрубочек силой стрессорного воздействия? 2. Кроме того, зависит ли сам окислительный стресс от микротрубочек? 3. Поскольку образование стрессовых гранул связано с ингибированием биосинтеза белка за счет фосфорилирования eIF2 α , возникает вопрос о том, как микротрубочки влияют на интенсивность биосинтеза белка и уровень фосфорилирования eIF2 α . Мы изучили зависимость формирования СГ от концентрации арсенита и скорость их формирования при небольшой концентрации арсенита. Оказалось, что СГ образуются в клетках по принципу «все или ничего», т. е. среднее количество СГ в имеющих СГ клетках практически постоянно. Количество же клеток, имеющих СГ, экспоненциально увеличивается при увеличении концентрации арсенита от 30 до 250 мкМ, причем при минимальной концентрации арсенита нокодазол ингибирует образование СГ, а при максимальной концентрации арсенита все клетки образуют СГ и в отсутствие микротрубочек. Мы обнаружили, что уровень общего белкового синтеза резко падает сразу после начала воздействия даже минимальными концентрациями арсенита и со временем меняется слабо. Корреляции между уровнем белкового синтеза и образованием СГ не

было. С уровнем фосфорилированной формы eIF2 α количество клеток с СГ коррелировало также слабо. Обработка клеток нокодазолом сама по себе вызывала фосфорилирование eIF2 α не индуцируя образование СГ. Уровень фосфорилированной формы eIF2 α после обработки арсенитом был всегда выше в клетках с разрушенными микротрубочками по сравнению с контрольными клетками. Разрушение микротрубочек не изменяло уровень окислительного стресса, индуцированного арсенитом.

В клетках с разрушенными микротрубочками СГ были всегда меньшего размера, чем в контрольных клетках. Таким образом, вероятнее всего, роль микротрубочек в формировании СГ состоит в перемещении и объединении компонентов стрессовых гранул в цитоплазме, облегчающих «встречу» этих компонентов. Нами разработана математическая модель, описывающая вклад микротрубочек в процесс формирования СГ. Есть вопросы, которые еще предстоит решить: почему происходит объединение неканонических инициаторных комплексов в достаточно крупные гранулы и почему существует значительная гетерогенность клеток при образовании СГ?

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-01107-а).

ПЛАСТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ГИППОКАМПЕ КРЫС, ИНДУЦИРОВАННЫЕ СУДОРОЖНОЙ АКТИВНОСТЬЮ: РОЛЬ β -CaMKII и GluR1-СУБЪЕДИНИЦЫ AMPA-РЕЦЕПТОРА. © Т. А. Савина,^{1,2} Т. Г. Щупакина.¹

¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Московская обл., и ² Пушчинский государственный университет, neurochem@mail.ru.

Ca^{2+} -кальмодулинзависимая протеинкиназа II (CaMKII) и AMPA-подтип глутаматных рецепторов являются важнейшими составляющими функционального комплекса, модулирующего эффективность синаптической передачи в глутаматергических нейронах. CaMKII фосфорилирует GluR1-субъединицы AMPA-подтипа рецептора по Ser831, таким образом регулируя постсинаптические токи через ионный канал рецептора. Мы предположили, что существует корреляция между изменением субъединичного состава CaMKII и фосфоросостояния GluR1-субъединицы AMPA-подтипа глутаматных рецепторов в зависимости от вида судорожного воздействия.

Работа выполнена на 3-месячных самцах крыс линии Крушинского—Молодкиной (КМ), обладающих наследственной предрасположенностью к аудиогенным судорогам. Крыс подвергали одной (1АС) или пяти (5АС) судорогам. Судорожные припадки у крыс линии КМ вызывали звуком (80 дБ, 12—15 кГц). В дальнейшем в гиппокампе животных экспериментальных групп методом иммуноблоттинга определяли содержание нейроспецифических α - и β -субъединиц CaMKII, общее содержание GluR1-субъединицы AMPA-рецептора и уровень ее Ser831-фосфоформы. Биохимические исследования проводили через 1, 3 и 14 сут после судорог.

Однократная судорога. Нами показано, что через 1 сут после 1АС уровень α - и β -субъединиц CaMKII в гиппокампе крыс не изменялся; общий уровень (но не содержание фосфоформы) GluR1 увеличивался на 30 % по сравнению с контролем (130.93 ± 2.14 и 100 ± 6.71 % со-

ответственно, $P < 0.01$), что может свидетельствовать об увеличении GluR1-гомомерных форм рецептора, обладающих Ca^{2+} -проводимостью. Через 3 сут в гиппокампе крыс линии КМ выявлено увеличение β -СаМКП по сравнению с интактной группой животных (156.52 ± 13.50 и 100 ± 10.03 % соответственно, $P < 0.01$), уровень GluR1 в гиппокампе крыс также был повышен (150.75 ± 4.04 и 100 ± 7.33 % соответственно, $P < 0.01$). Через 14 сут содержание субъединиц СаМКП в гиппокампе крыс экспериментальных групп не различалось, но и общий уровень GluR1 (100 ± 5.91 % в контроле и 72.73 ± 4.91 % в опытной группе, $P < 0.01$), и содержание ее фосфоформы (100 ± 12.27 и 65.93 ± 5.92 % соответственно, $P < 0.05$) в гиппокампе крыс опытной группы были достоверно ниже, чем в интактной группе.

5-кратные судороги. Характер изменений после 5АС отличался от изменений, индуцируемых 1АС. Так, содержание β -СаМКП было снижено на 60–80 % в гиппокампе крыс линии КМ через 1 сут (17.98 ± 2.82 % по сравнению со 100 ± 8.70 %, $P < 0.01$) и через 3 сут после судорог (33.70 ± 5.02 и 100 ± 16.82 % соответственно, $P < 0.01$) и не отличалось от интактного контроля через 14 сут. Общее содержание GluR1, напротив, повышалось через 1 сут после 5АС (132.28 ± 9.68 % по сравнению со 100 ± 10.92 % в контроле, $P < 0.05$), содержание ее фосфоформы также увеличивалось (157.89 ± 12.93 и 100 ± 9.51 % соответственно, $P < 0.01$). Примечательно, что к 14 сут после 5АС оба эти параметра были достоверно ниже контроля: общее содержание GluR1 составляло 80.16 ± 5.26 % по сравнению со 100 ± 5.02 % в контроле ($P < 0.01$), содержание фосфоформы составляло соответственно 72.28 ± 4.36 и 100 ± 11.0 % ($P < 0.05$). Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что обнаруженные нами изменения субъединичного состава СаМКП и уровня GluR1 в гиппокампе крыс линии КМ в ответ на судорожные воздействия являются важной составляющей особого гомеостатического механизма, обеспечивающего функциональное «перенастраивание» нейронов гиппокампа в зависимости от характера предшествующей нейрональной активности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-01254).

ВЛИЯНИЕ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК НА ЭНДОЦИТОЗ РЕЦЕПТОРА ЭФР. © А. В. Салова, Е. А. Леонтьева, Т. П. Моженок, Е. С. Корнилова, С. А. Кроленко, Т. Н. Беляева. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, avsalova@gmail.com.

Основные представления о динамике эндоцитоза рецептора ЭФР были сформированы на основе иммуофлуоресцентных исследований на фиксированных клетках. Неизвестно, насколько данные, получаемые при фиксации клеток, отражают нативные процессы, протекающие в живых клетках. Появившийся сравнительно недавно новый класс флуорофоров — квантовые точки (КТ) — обладает многими свойствами, позволяющими использовать их для прижизненной визуализации внутриклеточных процессов. Однако существует возможность влияния самих КТ на поведение меченных ими лигандов. Таким образом, необходимо детальное исследование того, насколько КТ «нейтральны» по отношению к процессам, в

которых участвуют меченные ими молекулы. Мы проследили динамику эндоцитоза комплексов ЭФР—КТ на живых клетках HeLa и сравнили с данными по динамике эндоцитоза немодифицированного ЭФР, полученными на фиксированных клетках. Обнаружили, что основные стадии эндоцитоза комплексов ЭФР—КТ, такие как интернализация, слияние эндосом, перемещение эндосом к околядерной области и кластеризация их там, не отличались от процессов, стимулированных немодифицированным ЭФР. Были охарактеризованы отдельные стадии эндоцитоза как ЭФР-, так и КТ—ЭФР-рецепторных комплексов. Окрашивание фиксированных клеток антителами на EEA1 маркером ранних эндосом на разных сроках после стимуляции эндоцитоза как ЭФР, так и ЭФР—КТ показало, что эндосомы в обоих случаях начинают колокализироваться с EEA1 через 10–20 мин после стимуляции эндоцитоза, причем степень колокализации достигает максимума через 30 мин и падает к 90 мин, что говорит о созревании эндосом. Эти данные также подтверждаются экспериментами, в которых клетки обрабатывали вортманнином, препятствующим формированию мультивезикулярных поздних эндосом. Как в случае стимуляции эндоцитоза немодифицированным ЭФР, так и в случае стимуляции ЭФР—КТ обнаруживались крупные везикулы, в которых ЭФР-рецепторные комплексы выявлялись только на внешней мембране. Было показано, что локализация эндосом, содержащих немодифицированный ЭФР и ЭФР—КТ, изменялась в ходе эндоцитоза одинаковым образом. При этом и те, и другие эндосомы локализовались в непосредственной близости от микротрубочек. На позднем этапе эндоцитоза происходит взаимодействие поздних эндосом с лизосомами, приводящее к деградации рецептора. Действительно, в случае немодифицированного ЭФР на фиксированных клетках через 120–150 мин после стимуляции ЭФР-рецепторные комплексы практически не выявляются. Напротив, при использовании ЭФР—КТ КТ—ЭФР-рецепторные комплексы остаются в клетках на этом сроке, но не колокализуются с Lamp1, маркером лизосом. КТ в околядерных структурах выявляются даже через 24 ч. Это может означать, что КТ препятствуют попаданию ЭФР-рецепторных комплексов в лизосомы. Однако оказалось, что через 24 ч КТ колокализуются с Lamp1, при этом рецептор в этих структурах отсутствует. Это свидетельствует о том, что поздние эндосомы, содержащие ЭФР—КТ, все же сливаются с лизосомами. Вопрос о длительности пребывания ЭФР—КТ в комплексе с рецептором в поздних эндосомах является очень существенным с точки зрения их участия в сигнальных процессах, так как для окончательного физиологического ответа клетки на внешний стимул существенно не только наличие или отсутствие определенных внутриклеточных сигналов, но и их длительность.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований президиума РАН № 22 по нанотехнологиям и Междисциплинарного проекта СПбНЦ.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ КАНАЛОВ TRPV5 И TRPV6 В НОРМАЛЬНЫХ И ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА. © С. Б. Семенова, И. О. Васильева, В. Н. Томили, Ю. А. Негуляев. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Рост внутриклеточной концентрации Ca^{2+} является одним из ранних ответов в цепи событий, сопровождающих активацию лимфоцитов антигеном. Эти события включают в себя изменение подвижности и формы Т-клеток, транскрипцию генов и усиление экспрессии на Т-лимфоцитах рецептора IL-2R (CD25), продукцию IL-2 и пролиферацию. В последние несколько лет накопилось достаточное количество информации о регуляторной роли Ca^{2+} -каналов в созревании и пролиферации лимфоцитов. Они были подтверждены работами, которые показали, что при отсутствии Ca^{2+} в культуральной среде лимфоциты не могут быть активированы к пролиферации митогенными агентами, а также показали, что блокаторы кальциевых каналов и ингибиторы кальмодулина подавляют пролиферативный ответ лимфоцитов, индуцированный митогенами.

Принято считать, что Ca^{2+} поступает в клетки крови через CRAC-каналы (calcium release activating channels), активирующиеся при освобождении внутриклеточных Ca^{2+} -депо. Однако открытие суперсемейства каналов TRP существенно увеличило число потенциальных кандидатов, участвующих в поступлении кальция в электрически невозбудимые клетки, в том числе в клетки крови. Известно, что члены этого суперсемейства вовлечены в обонятельную, температурную, болевую, механическую и прочие виды рецепции, а также участвуют в ответах клеток на изменение pH, осмолярности и метаболический стресс. Показано, что мутации в некоторых белках TRP сопряжены с онкологическими и нейродегенеративными заболеваниями.

Два члена этого суперсемейства — каналы TRPV5 и TRPV6 (transient receptor potential vanilloid) — являются высокоселективными Ca^{2+} -каналами, которые участвуют в Ca^{2+} -реабсорбции в эпителиальных клетках тонкого кишечника, почек и плаценты. Ранее мы обнаружили, что Ca^{2+} -каналы TRPV5 и TRPV6 эндогенно коэкспрессируются в клетках миелоидной (K562) и лимфоидной (Jurkat) лейкемии человека. В данном исследовании мы провели сравнительный анализ экспрессии этих каналов в клетках лейкемии и нормальных лимфоцитах человека, который показал, что уровень мРНК TRPV5 и TRPV6 значительно выше в клетках K562 и Jurkat, чем в нормальных лимфоцитах. Далее было показано, что экспрессия TRPV6 существенно увеличивалась при стимуляции лимфоцитов к пролиферации митогенным лектином — фитогемагглютинином (ФГА). Кроме того, были проведены эксперименты, которые показали, что в присутствии блокатора кальциевых каналов TRPV5 и TRPV6 снижается пролиферация в клетках Jurkat и активированных к пролиферации лимфоцитах. Совокупность полученных данных указывает на взаимосвязь между экспрессией TRPV6 и пролиферативным статусом лимфоцитов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 11-04-01030-а) и программы РАН «Молекулярная и клеточная биология».

АМИЛОРИД-НЕЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ НАТРИЕВЫЕ КАНАЛЫ СЕМЕЙСТВА ENaC В КЛЕТКАХ K562 И U937. © А. В. Сударикова, И. О. Васильева, Е. А. Морачевская, Ю. А. Негуляев. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, nastya@mail.cytspb.rssi.ru.

Быстрые изменения мембранного транспорта катионов (Na^+ , Ca^{2+} и Mg^{2+}) связаны в первую очередь с функ-

ционированием ионных каналов. В настоящее время сформировались представления о семействах потенциалнезависимых ионных каналов. Потенциалнезависимые натриевые каналы были обнаружены в перитонеальных макрофагах, в гладкомышечных клетках, клетках карциномы A431, лимфомы U937 и лейкемии K562. Молекулярная природа этих каналов остается неясной. Как возможные молекулярные корреляты могут рассматриваться белки семейства DEG/ENaC (дегенерины/эпителиальные натриевые каналы). Основная цель настоящей работы — молекулярная и функциональная идентификация потенциалнезависимых натриевых каналов в клетках миелоидной лейкемии человека K562 и лимфомы U937. Методом ОТ-ПЦР мы показали, что в клетках K562 и U937 экспрессируются α -, β - и γ -субъединицы натриевого канала ENaC. С помощью метода патч-кламп регистрировали ионные токи через натриевые каналы на «целой клетке» (whole-cell) и в изолированных фрагментах мембран (inside-out, outside-out). Проводимость одиночных каналов составляла около 12 пСм. В варианте регистрации токов whole-cell проверили действие диуретика амилорида, специфического блокатора ENaC, на исследуемые каналы. В клетках как K562, так и в U937 добавление амилорида (10—100 мкМ) в камеру не приводило к существенному изменению интегрального тока. На уровне одиночных каналов также не было выявлено изменений амплитуды и времен открытого и (или) закрытого состояний при действии амилорида (регистрация outside-out и whole-cell). Таким образом, потенциалнезависимые натриевые каналы в клетках K562 и U937 не блокируются амилоридом. Наряду с фармакологическим подходом для функциональной идентификации каналов изучена проницаемость каналов для двухвалентных катионов. Установлено, что натриевые каналы не проводят ионы Mg^{2+} и Ca^{2+} , причем как при физиологических (1—2 мМ), так и при более высоких (10—20 мМ) концентрациях в растворе с наружной стороны мембраны.

Как показано ранее и подтверждено в наших исследованиях, активация и инактивация натриевых каналов в клетках K562 контролируются процессами сборки—разборки примембранного цитоскелета. В наших экспериментах на изолированных фрагментах мембран клеток U937 (конфигурация inside-out) обнаружена активация натриевых каналов (проводимость 11—12 пСм) при действии цитохалазина Д (10 мкг/мл). Добавление к цитоплазматической стороне мембраны глобулярного актина, который полимеризуется при повышении ионной силы раствора, приводило к инактивации каналов.

Таким образом, функциональные свойства натрий-проводящих каналов в клетках U937 близки к характеристикам каналов, обнаруженных ранее в клетках K562. На основании электрофизиологических экспериментов и данных анализа ОТ-ПЦР можно сделать вывод о том, что в плазматической мембране клеток K562 и U937 экспрессируются амилорид-нечувствительные каналы, относящиеся к семейству ENaC.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-00995а) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

АКТИВАЦИЯ КАСПАЗЫ-3 ПРИ НЕЙРОНАЛЬНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ КЛЕТОК. © К. А. Трizza, А. А. Яковлев,

К. А. Глухова, О. В. Прусакова, И. П. Белецкий. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Московская обл.

Каспаза-3, принадлежащая большому семейству цистеиновых протеаз, является основным эффектором реализации программы клеточной гибели, и, как правило, активацию каспазы-3 интерпретируют как апоптотический признак. Однако каспаза-3 может выполнять ряд важных неапоптотических функций: принимать участие в регуляции клеточного цикла, процессинге цитокинов, дифференцировке миоцитов и кератиноцитов, и есть основания полагать, что именно каспазе-3 принадлежит важная роль в дифференцировке клеток нейрональной природы.

В нашей работе проведено исследование роли каспазы-3 в дифференцировке нейробластомных клеток под действием различных агентов. Было показано, что в культуре клеток нейробластомы В 103 через 24 ч после индукции форсколином (активатором аденилатциклазы) активность каспазы-3 увеличивается в 2 раза по отношению к контрольным клеткам. Кроме того, блокирование экспрессии гена прокаспазы-3 или использование ингибитора каспаз приводило к снижению степени дифференцировки. Аналогичные результаты были получены при добавлении 8-Bromo-cAMP и Dibutyryl-cAMP. В противоположность этому дифференцировка, вызванная форболовым эфиром (PMA), не сопровождалась изменением активности каспазы-3. Примечательно, что эксперименты по измерению активности каспаз-8-, 9- и калпаина, рассматриваемых в качестве потенциальных активаторов каспазы-3, продемонстрировали отсутствие каких-либо изменений активности этих ферментов.

Таким образом, можно утверждать, что каспаза-3 необходима для реализации процессов дифференцировки. Дальнейшие исследования необходимы для понимания механизмов регуляции ферментативной активности каспазы-3 и идентификации основных участников внутриклеточных каскадов, опосредующих дифференцировку.

СОЗДАНИЕ ЛЕНТИВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В ХОЛИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНАХ СЕПТУМА ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА. © Г. Р. Тухбатова. Лаборатория молекулярной нейробиологии Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва.

Лентивирусная трансдукция является на данный момент одним из самых эффективных методов переноса генетического материала в клетки *in vivo*, что делает данный метод наиболее предпочтительным при работе с клетками нервной системы *in vivo*. Данная технология может быть использована для различных целей, в том числе при разработке подходов к коррекции функциональных нарушений мозга при патологических состояниях.

Известно, что нейротрофические факторы играют важную роль в жизнеспособности нейронов при нейродегенеративных расстройствах, таких как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона.

В моей работе я нашла оптимальные условия для приготовления лентивирусных частиц последующего введения в ЦНС экспериментальных животных. Я подобрала оптимальные условия для трансфекции клеток-упаковщиков полиэтиленгликолем. Высокая эффективность транс-

фекции в среде без сыворотки наблюдалась при плотности клеток 60 % от максимального и соотношении ДНК : полиэтиленгликоль 1 : 1.5. Показано, что эти условия трансфекции могут быть использованы для получения суспензии частиц лентивирусов для эффективной трансдукции нервных клеток в естественных условиях.

Были созданы лентивирусные векторы, содержащие последовательности фактора роста нервов (ФРН), нейротрофического фактора, выделенного из мозга (BDNF), нейротрофического фактора, выделенного из глиальных клеток (GDNF) под нейрон-специфичным промотером — альфа-кальмодулинзависимой киназы II (СAМКII). Планируется использовать эти лентивирусные векторы в амлоидозной модели болезни Альцгеймера с целью повышения жизнеспособности холинергических нейронов, а также исследовать сигнальные пути, посредством которых ФРН повышает выживаемость холинергических нейронов септума в этой же модели нейродегенерации.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА В МИГРИРУЮЩЕЙ КЛЕТКЕ. © П. А. Тюрин-Кузьмин,¹ К. М. Ага-ронян,¹ В. В. Белоусов,² А. В. Воронников. ¹ Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М. В. Ломоносова и ² Институт биоорганической химии РАН им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва.

Направленная миграция клеток лежит в основе эмбрионального развития, ангиогенеза, ранозаживления и репарации тканей. Миграция опухолевых клеток является ключевым звеном в метастазировании раковых опухолей. Фосфатидилинозитол-3,4,5-трисфосфат (PIP₃) плазматической мембраны считается ключевым регулятором направленной миграции клеток. При хемотаксисе и при спонтанной миграции (движении) клеток без внешних направляющих стимулов PIP₃ накапливается на переднем крае клетки, определяя место формирования ламеллиподии. В случае хемотаксиса выбор направления движения клетки, а значит, и локализация PIP₃ определяются градиентом хемоаттрактанта. Чем задается направление поляризации клеток при спонтанной миграции, в настоящее время неясно.

Недавно было показано, что пероксид водорода (H₂O₂) принимает участие в регуляции миграции клеток, однако механизм его действия до сих пор непонятен. В настоящей работе мы исследовали локализацию H₂O₂ в цитоплазме мигрирующих фибробластов. Для прижизненного наблюдения за H₂O₂ мы использовали генетически кодируемый флуоресцентный биосенсор НуРег. Он обладает высокой чувствительностью и специфичностью к H₂O₂ и при взаимодействии с ним изменяет спектр возбуждения флуоресценции. Экспрессируя биосенсор в спонтанно мигрирующих фибробластах NIH/3T3, мы обнаружили, что в неподвижных клетках градиент H₂O₂ отсутствует. При этом H₂O₂ неравномерно распределен в цитоплазме мигрирующих клеток, и его концентрация повышена в тех областях клеток, которые обращены в сторону движения. При помощи нового биосенсора, регистрирующего сразу две сигнальные молекулы — H₂O₂ и PIP₃, — мы смогли сопоставить их градиенты в цитоплазме отдельных мигрирующих клеток. Мы обнаружили, что накопление H₂O₂ совпадает во времени и в пространстве с внутриклеточным градиентом PIP₃, хотя не всегда строго ему соответствует. Участки повышенного уровня H₂O₂ в большинстве случаев маркируют зоны повышенной псев-

доподиальной активности, и изменение внутриклеточной локализации пероксидного сигнала часто связано с соответствующими изменениями участков возникновения новых протрузий. Полученные данные позволяют предположить новый H_2O_2 -зависимый механизм эндогенной поляризации клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 11-04-01519-а).

ЭКСПРЕССИЯ СТРЕССОВЫХ И СИГНАЛЬНЫХ БЕЛКОВ МАКРОФАГАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ЛИНИИ RAW 264.7 В ПРИСУТСТВИИ РЯДА ИНГИБИТОРОВ СИГНАЛЬНЫХ КАСКАДОВ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ СТРЕССЕ. © М. О. Хренов, С. Б. Парфенюк, О. В. Глушкова, Т. В. Новоселова, С. М. Лушин, Е. Г. Новоселова. Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Московская обл.

Известно, что воспаления септической природы сопровождаются активацией сигнальных каскадов. По этой причине растет количество работ, направленных на поиски природных и синтетических ингибиторов различных сигнальных путей как возможных терапевтических агентов, способных снижать уровень интоксикации организма при воспалениях, вызванных бактериальными токсинами.

Целью работы было исследование эффективности ряда ингибиторов активности TLR4 и сигнальных каскадов NF- κ B, а также SAPK/JNK на клетках линии RAW 264.7 в условиях токсического стресса, вызванного бактериальным липополисахаридом (ЛПС), выделенным из стенок грамотрицательных бактерий *Escherichia coli*. Использовали специфические ингибиторы, которые действовали на разных этапах этих каскадов внутриклеточной сигнализации: на уровне рецептора TLR4 (ингибитор CLI-095), на этапе фосфорилирования ингибиторной молекулы I κ B, ключевой ступени активации каскада NF- κ B (ингибитор IKK Inhibitor XII), а также на этапе активации пути JNK (ингибитор SP600125). В качестве основных маркеров стрессовой реакции клеток на действие ЛПС оценивали экспрессию индуцибельных форм белков теплового шока БТШ72 и БТШ90- α , а также измеряли уровень активации исследуемых каскадов, оценивая экспрессию фосфорилированных форм сигнальных белков.

Ранее нами было установлено, что в макрофагальных клетках RAW 264.7 ЛПС стимулирует продукцию провоспалительных цитокинов и белков теплового шока. В настоящей работе показано, что в клетках, предварительно обработанных ингибиторами, экспрессия белков теплового шока БТШ72 и БТШ90- α в ответ на действие ЛПС значительно снижена, вплоть до контрольного уровня. Это означает, что все три исследованных ингибитора защищают клетки RAW 264.7 от токсического стресса.

На следующем этапе работы определяли уровень продукции сигнальных белков. В клетках RAW 264.7 показана стимуляция экспрессии рецепторного белка TLR4, а также белков pNF- κ B и pSAPK/JNK в присутствии эндотоксина, при этом превентивное использование ингибиторов снижало практически до контрольных значений экспрессию TLR4 и фосфорилирование сигнальных белков. Кроме этого, было установлено, что использованные ингибиторы в разной степени подавляли продукцию фосфорилированной формы белка NF- κ B, а также двух изо-

форм белка JNK как в условиях токсического стресса, индуцированного добавлением ЛПС, так и без последующего воздействия токсина. Более эффективным оказался ингибитор начального этапа каскадов внутриклеточной сигнализации на уровне рецептора TLR4.

Таким образом, проведенная нами с использованием клеток RAW 264.7 работа позволила установить, что все использованные ингибиторы в условиях токсического стресса, вызванного бактериальным ЛПС, заметно снижали провоспалительный ответ клетки, уменьшая продукцию белков теплового шока и активацию сигнальных каскадов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 10-04-00351-а и 11-04-00023-а), программы президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине» (2011 г.), гранта президента РФ по поддержке ведущих научных школ (НШ-3202.2010.4).

НИКОТИНОВЫЕ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ: ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ И РАЗНООБРАЗИЕ ФУНКЦИЙ. © В. И. Цетлин. Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва.

Никотиновый ацетилхолиновый рецептор (АХР) из ската *Torpedo* был первым рецептором, для которого с помощью электронной микроскопии более 30 лет назад была установлена общая форма молекулы. После установления в 2001 г. кристаллической структуры ацетилхолин-связывающего белка (АХБ) — модели лигандсвязывающих доменов АХР — было получено разрешение 4 Å для криоэлектронной структуры АХР *Torpedo*. Сходное строение должны иметь все АХР — мышечные, нейрональные и «нейрональные» (построенные из тех же субъединиц, что и нейрональные АХР, но находящиеся на клетках иммунной системы и других тканей) (Tsetlin et al., 2001). Структурное разнообразие АХР обеспечивается комбинациями составляющих субъединиц и проявляется в диапазоне активностей — от мышечного сокращения до когнитивных функций. С нарушениями работы АХР сопряжены мышечные дистрофии, психические и нейродегенеративные заболевания. α -Нейротоксины змей, их радиоактивные и флуоресцентные производные используются для характеристики лигандсвязывающего домена АХР и для определения уровней подтипов АХР в норме и при патологиях: так, нами разработан флуоресцентный метод детекции нейрональных $\alpha 7$ АХР (Shelukina et al., 2009). Сходное с α -нейротоксинами строение имеет и «эндогенный прототоксин» Lynx1, прикрепленный GPI-якорем к мембране в мозге вблизи АХР и регулирующий его активность. В нашем институте получен водорастворимый домен Lynx1 и с помощью радиолигандного анализа и электрофизиологии впервые показано, что в зависимости от его концентрации есть как ингибирование, так и потенцирование различных АХР (Lyukmanova et al., 2011). Другой инструмент исследования АХР — α -конотоксины из ядовитых моллюсков *Conus*. Совместно с голландскими кристаллографами установлена первая кристаллическая структура. АХБ в комплексе с -конотоксином (Celie et al., 2005) позволил открыть новые пути к созданию эффективных антагонистов, избирательных к определенным подтипам АХР. В сотрудничестве с бель-

гийскими кристаллографами установлены кристаллические структуры комплексов АХБ с низкомолекулярными алкалоидными антагонистами — d-тубокурарином и стрихнином (Brams et al., 2011): впервые показано, что в пяти участках связывания пентамерного АХБ лиганды могут принимать различные ориентации, что необходимо учитывать при компьютерном моделировании рецепторных комплексов и интерпретации результатов мутагенеза. Хотя канальные характеристики АХР зависят в первую очередь от трансмембранного фрагмента М2, заметное влияние оказывают также и некоторые остатки лигандсвязывающего и внутриклеточного доменов. В совместной работе с немецкими нейробиологами установлено, что более сильные токи в ответ на аппликацию агониста к $\alpha 3\beta 4\alpha 5$ АХР мозга по сравнению с $\alpha 3\beta 2\alpha 5$ АХР обусловлены всего одним остатком цитоплазматического домена S435 $\beta 4$ -субъединицы, важным для уменьшения никотиновой зависимости (Silke et al., 2011).

Список литературы

- Tsetlin V. et al. 2011. Assembly of nicotinic and other Cys-loop receptors. *J. Neurochem.* 116: 734—741.
- Shelukhina I. V. et al. 2009. Presence of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors on dorsal root ganglion neurons proved using knockout mice and selective alpha-neurotoxins in histochemistry. *J. Neurochem.* 109: 1087—1095.
- Lyukmanova E. N. et al. 2011. NMR structure and action on nicotinic acetylcholine receptors of water-soluble domain of human Lynx 1. *J. Biol. Chem.* 286 (12) : 10 618—10 627.
- Celie P. H. et al. 2005. Crystal structure of nicotinic acetylcholine receptor homolog AChBP in complex with an alpha-conotoxin PnIA variant. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12: 582—588.
- Brams M. et al. 2011. A structural and mutagenic blueprint for molecular recognition of strychnine and d-tubocurarine by different Cys-loop receptors. *PLoS Biol.* 2011 Mar; 9(3) : e1001034. Epub 2011 Mar 29.
- Silke S. et al. 2011. Aversion to nicotine is regulated by the balanced activity of beta4 and alpha5 nicotinic receptor subunits in the medial habenula. *Neuron.* (In press).

НОВЫЙ МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ ПОТЕНЦИАЛА МИТОХОНДРИЙ МАЛОЙ ГТФАЗОЙ Rac1. © И. С. Черношваненко, А. А. Минин. Институт биологии развития РАН и Институт белка РАН, Москва.

Способность генерировать и поддерживать потенциал на внутренней мембране является неотъемлемым свойством митохондрий, которое лежит в основе практически всех выполняемых ими функций, таких как синтез АТФ и снабжение клетки энергией, образование активных форм кислорода, регуляция концентрации Ca^{2+} в цитоплазме и запрограммированная клеточная смерть — апоптоз. Уровень потенциала митохондрий контролируется различными внешними и внутренними факторами, механизмы действия которых изучены недостаточно.

Ранее нами было обнаружено, что уровень потенциала митохондрий зависит от наличия виментиновых промежуточных филаментов в клетке. Восстановление сети промежуточных филаментов в безвиментиновых мышечных клетках при помощи экспрессии человеческого виментина приводило к увеличению уровня потенциала митохондрий. По нашим данным, за увеличение уровня потенциала отвечает N-концевой участок молекулы виментина. В этом участке располагается несколько остат-

ков Ser, которые являются сайтами фосфорилирования известных протеинкиназ. Один из этих остатков — Ser56 — фосфорилируется p-21 активируемой киназой (РАК), которая является одним из эффекторов малой ГТФазы Rac1. Такое фосфорилирование приводит к нарушению связи митохондрий с виментиновыми промежуточными филаментами. Поэтому мы предположили, что активация белка Rac1 и последующее фосфорилирование виментина по Ser56 могут приводить к изменению уровня потенциала митохондрий.

При помощи потенциалзависимого флуоресцентного красителя MitoTracker Red мы обнаружили, что экспрессия конститутивно-активного мутанта белка Rac1 приводит к снижению потенциала митохондрий. Затем при помощи экспрессии ингибиторного домена киназы РАК (PID) мы убедились, что снижение потенциала при активации белка Rac1 обусловлено активацией киназы РАК. При помощи экспрессии мутантов виментина, имитирующих фосфорилированное и дефосфорилированное состояния остатка Ser56, мы убедились, что снижение потенциала митохондрий при активации белка Rac1 происходит только в клетках, содержащих виментин, способный к фосфорилированию по Ser56. Используя генетически кодируемый биосенсор к пероксиду водорода, мы также проанализировали уровень образования активных форм кислорода в митохондриях в зависимости от их связывания с виментиновыми промежуточными филаментами и при активации белка Rac1.

Таким образом, наши данные свидетельствуют о наличии нового механизма регуляции потенциала митохондрий с участием виментиновых промежуточных филаментов, белка Rac1 и его эффектора протеинкиназы РАК.

Работа выполнена при финансовой поддержке РАН и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-00414-a).

МЕХАНОЗАВИСИМАЯ АКТИВАЦИЯ КАТИОННЫХ КАНАЛОВ В ФИБРОБЛАСТАХ VALB/3T3 и 3T3B-SV40. © В. И. Чубинский-Надеждин, Т. Н. Ефремова, Е. А. Морачевская. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, elenmo@mail.cytspb.rssi.ru

Работа ориентирована на выяснение роли актинового цитоскелета в регуляции ионных каналов, а также особенностей их функций в трансформированных клетках. С использованием метода локальной фиксации потенциала (patch-clamp) проведено сравнительное исследование механочувствительных каналов в эмбриональных фибробластах мышцы иммортализованных линий VALB/3T3 и 3T3B-SV40, полученных из Коллекции клеточных культур Института цитологии РАН. С помощью различных вариантов метода патч-кламп регистрировали ионные токи через одиночные каналы в участке плазматической мембраны неповрежденной клетки (конфигурация cell-attached) или в изолированном мембранном фрагменте (inside-out). На основании анализа записей токов при различных уровнях мембранного потенциала получали характеристики одиночных каналов, идентифицировали их по проводимости и селективности, количественно оценивали уровень активности. В экспериментах на фибробластах обнаружена быстрая активация ионных токов входящего направления в ответ на механический стимул — локальное растяжение (stretch) мембраны. Стимуляцию

осуществляли путем подачи «отрицательного» ($\Delta P < 0$) гидростатического давления через регистрирующую («патчевую») пипетку. Не было отмечено заметных различий в уровне стимула (50—70 мм рт. ст.), необходимого для активации каналов в клетках линии BALB/3T3 и в тех же клетках, трансформированных вирусом SV40, характеризующихся, как известно, различной степенью развития актинового сети. В опытах с заменой анионов (inside-out) была подтверждена катионная природа стретчиндуцированных токов. Судя по полученным данным, в мембране культивируемых фибробластов функционируют механочувствительные стретчактивируемые каналы, типичные для клеток эукариот. Унитарная проводимость составляла 19—25 пСм, частота встречаемости не превышала 30 % ($n = 60$). Следует, однако, отметить, что регистрация активности одиночных каналов в мембране фибробластов сопряжена со значительными методическими сложностями (по сравнению с экспериментами на клетках K562). Проведенный анализ не выявил существенных различий биофизических характеристик и параметров активации механочувствительных катионных каналов в нормальных и трансформированных клетках. Отличительной особенностью механочувствительных каналов в фибробластах являлась задержка (2—3 с) инактивации после снятия стимула, что может быть обусловлено взаимодействием с внеклеточным матриксом.

В экспериментах на культивируемых эмбриональных фибробластах BALB/3T3 и 3T3B-SV40 была также обнаружена механозависимая активация калиевых каналов, обусловленная, по-видимому, стретчиндуцированным входом катионов в цитоплазму из внеклеточной среды. Активность калиевых каналов, вероятно, модулируется уровнем свободного ионизированного кальция в цитозоле. Регистрация токов через одиночные каналы, их кинетическое поведение и вольт-амперная характеристика позволяют полагать, что поступление ионов кальция через механоправляемые (mechanogated) каналы активирует «колокализированные» калиевые каналы. Обнаруженный феномен интересен с точки зрения проблем передачи сигнала и выяснения путей механозависимой регуляции каналов в клетках млекопитающих.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ PD98059 И U0126 НА ИЗМЕНЕНИЕ СВОЙСТВ МИКРОТРУБОЧЕК В ХОДЕ ЭНДОЦИТОЗА ЛИГАНД-РЕЦЕПТОРНЫХ КОМПЛЕКСОВ В КЛЕТКАХ HeLa. © М. А. Шкляева,^{1,2} Ю. Ю. Стеблянская,^{1,2} Е. С. Корнилова,¹ М. В. Злобина.¹ ¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и ² С.-Петербургский государственный университет.

Связывание эпидермального фактора роста (ЭФР) с его рецептором на плазматической мембране приводит к активации тирозинкиназы рецептора, следствием которой является стимуляция ряда сигнальных каскадов. Одновременно ЭФР-рецепторные комплексы поступают внутрь клетки с помощью рецепторопосредованного эндоцитоза. Рецепторсодержащие эндосомы закрываются на плюс-концах микротрубочек (МТ) и перемещаются по ним в околядерную область (ОЯО), претерпевая ряд по-

следовательных изменений в ходе процесса созревания. На конечном этапе ЭФР-рецепторные комплексы подвергаются деградации в результате слияния зрелых поздних эндосом с лизосомами. Ранее нами было показано, что МТ в ходе эндоцитоза подвергаются ремоделированию (Kharchenko et al., 2007. Cell Biol. Int. 31 (4) : 349—359): на ранних стадиях эндоцитоза эндосомы перемещаются по прямым радиальным МТ в ОЯО, затем МТ частично деполимеризуются, восстанавливаясь к поздним этапам.

Одним из механизмов ремоделирования тубулинового цитоскелета в ходе эндоцитоза могут быть сигналы, опосредуемые рецептором ЭФР, в частности MAP-киназный каскад, приводящий к активации ERK1/2. Интерес именно к этой киназе связан с данными о том, что она может регулировать активность одного из так называемых МТ-повреждающих белков — статмина. Задачей настоящей работы был анализ влияния широко применяемых ингибиторов ERK1/2, U0126 и PD98059 на реорганизацию МТ в ходе эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов.

Эксперименты выполняли на культивируемых клетках эпителия линии HeLa-Kyoto. Методом конфокальной микроскопии показали, что в контрольных, не обработанных ингибиторами клетках, радиальная система МТ полностью восстанавливалась уже к 15 мин после стимуляции эндоцитоза ЭФР по схеме с предварительным связыванием лиганда. Через 30—60 мин наблюдались уменьшение числа МТ и отсутствие их в ОЯО, что свидетельствует о частичной деполимеризации МТ. На более поздних сроках тубулиновый цитоскелет вновь образовывал достаточно густую сеть искривленных МТ. Ацетилирование МТ, характерное для стабильных долгоживущих МТ, было незначительным вплоть до 30—60 мин эндоцитоза, затем возрастало, а к 150 мин, как правило, снижалось до уровня, наблюдаемого в не обработанных ЭФР клетках.

В присутствии U0126 (10 мкМ) наблюдалась деполимеризация МТ вскоре после стимуляции эндоцитоза. Степень и длительность деполимеризации системы МТ варьировали от эксперимента к эксперименту, но всегда были более выражены и длились дольше, чем в контрольных клетках. В соответствии с этим и эндосомы не демонстрировали кластеризации в ОЯО с течением времени. Их размеры также увеличивались незначительно, что свидетельствует о низкой эффективности слияний эндосом, в норме сопутствующих процессу созревания. Уровень ацетилирования МТ был незначителен на ранних стадиях, увеличиваясь к 60—90 мин.

Другой широко применяемый ингибитор MAP-киназы — PD98059 (50 мкМ) — демонстрировал несколько неожиданный эффект: во всех случаях он уменьшал наблюдаемую в контроле степень деполимеризации МТ в ОЯО. Интересно, что количество стабильных, ацетилированных МТ изменялось при этом так же, как и в контрольных клетках, т. е. было невелико на стадии, когда эффект PD оказывался наиболее выражен. Изменение локализации эндосом в этом случае отличалось от контроля незначительно.

В настоящий момент неясно, в чем причина такого парадоксального действия двух ингибиторов, используемых для анализа участия ERK1/2 в различных процессах. Возможно, оно связано с различными механизмами действия U0126 и PD98059: действительно, хотя результатом их действия является подавление фосфорилирования, а следовательно, и активации MAP-киназы вышестоящей

МЕК1/2-киназой, непосредственным субстратом обоих ингибиторов является именно МЕК1/2. При этом U0126 подавляет киназную активность МЕК1/2, тем не менее не препятствуя ее фосфорилированию, тогда как PD98059 ингибирует и собственную активность, и фосфорилирование МЕК1/2 другими киназами (Zelivianski et al., 2003. *Int. J. Cancer*, 107: 478—485). Очевидно, что если действие U0126 укладывается в гипотезу о ERK-зависимой активации/деактивации МТ-повреждающего белка статина, то эффект PD98059 в эту схему не вписывается. Возможно, что в этом случае наблюдаемый эффект связан с вовлечением других, отличных от МЕК1/2-зависимых сигнальных путей, в результате которых деактивируются статин или другие белки, дестабилизирующие МТ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-01215), программы МКБ и гранта президента РФ для поддержки ведущих научных школ (НШ-3273.2010.4).

РОЛЬ МОНОВАЛЕНТНЫХ ИОНОВ В РЕГУЛЯЦИИ ВОДНОГО БАЛАНСА КЛЕТОК ПРИ АПОПТОЗЕ.
© В. Е. Юринская, А. А. Рубаикин, А. В. Широкова, А. А. Веренинов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, v.yurinskaya@mail.ru

Характерная особенность апоптоза состоит в том, что «программируемое» разрушение клеток — апоптоз — в отличие от «непрограммируемой» их гибели не сопровождается неспецифическим увеличением проницаемости клеточной мембраны, набуханием клетки и неконтролируемым нарушением целостности клеточной мембраны. Нами впервые проведен полный анализ осмотического баланса клетки при апоптозе и показано, почему при апоптозе клетки не набухают. Исследовали известную экспериментальную модель апоптоза — культивируемые клетки гистиоцитарной лимфомы человека U937, апоптоз которых вызывается стауроспорином. Определяли изменение при апоптозе содержания в клетках воды, трех главных моновалентных ионов — K^+ , Na^+ и Cl^- — и суммарного содержания остальных внутриклеточных осмолитов. Установлено, что общее уменьшение содержания осмолитов, приводящее к апоптотной дегидратации клеток, в типичном случае, когда апоптоз вызывается 4-часовой инкубацией клеток в среде с концентрацией стауроспорина 1 мкМ, обусловлено на 2/3 уменьшением суммарного содержания моновалентных ионов и на 1/3 уменьшением содержания других осмолитов. Помимо определения баланса осмолитов были измерены потоки $K^+(Rb^+)$ и $^{36}Cl^-$, что позволило проанализировать баланс входных и выходных потоков K^+ , Na^+ и Cl^- по главным трактам переноса моновалентных ионов через плазматическую мембрану: Na^+/K^+ -насос, электродиффузионные каналы и системы котранспорта $Na-Cl$ и $NaK2Cl$. Сделан вывод о том, что при апоптозе, сопровождающемся относительно небольшой дегидратацией, когда активность Na^+/K^+ -насоса заметным образом не уменьшается, изменение внутриклеточного содержания осмолитов обусловлено увеличением интегральной проницаемости калиевых каналов, тогда как более значительная апоптотная дегидратация связана со снижением активности Na^+/K^+ -насоса и уменьшением интегральной проницаемости натриевых каналов без существенного изменения ин-

тегральной проницаемости калиевых каналов. Результаты частично опубликованы в статьях: Юринская и др. *Цитология*, 2010, 52 (7) : 562—567; Yurinskaya et al. *J. Physiol.*, 2011, 589 (9) : 2197—2211 (DOI: 10.1113/jphysiol.2011.207571).

РЕЛИКТОЭКОЛОГИЯ КАК ОСНОВА ПОСТОЯННОЙ ГЕНЕРАЦИИ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ СИГНАЛОВ ПЕРВИЧНЫХ И ВТОРИЧНЫХ БИОГЕННЫХ ИЗЛУЧЕНИЙ.
© С. С. Юров,¹ И. М. Дмитриевский.² ¹Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Московская обл., и ²Национальный исследовательский ядерный университет — МИФИ, Москва.

Ранее на основе разработанного нами магнитно-резонансного механизма (МРМ) было показано, что реликтовое излучение (РИ) Вселенной (или всеобщий фон, состоящий из четырех известных компонент-переносчиков фундаментальных физических взаимодействий) способно индуцировать постоянно во всех атомах (конечно, в том числе и атомах биологических структур клеток) начальные акты слабого циркулярно-поляризованного фотонного первичного излучения (ПИ). Этот постоянный процесс, названный И. М. Дмитриевским (1992—2002) реликто-экологией, решил столетний парадокс существования стационарных квантовых орбит электрона в атомах. Энергия, теряемая электроном (как заряженной частицы, движущейся с ускорением), компенсируется энергией резонансно поглощаемых реликтовых фотонов, после этого электрон возвращается в прежнее состояние и так до бесконечности. Вот почему электроны никогда не падают на ядро атома, вот почему существует постоянных 118 типов атомов Периодической системы Д. И. Менделеева, учитывая при этом нестабильные радиоактивные изотопы. Это абсолютно касается и живой природы — биологии. И только в живой клетке первичное излучение (на основе эволюционно созданных природой наиважнейших клеточных структур) накапливается количественно и переходит в принципиально новое качественное образование — вторичное биогенное излучение (ВБИ). Вот где впервые проявляется наиважнейшая связь неживой и живой природы — основы радиоэкологии, т. е. настоящей биофизики. Именно в клетке находятся необычно важные внутренние структуры — нуклеопротеиды (ДНК+белок+РНК). Наши результаты показывают что только в нуклеопротеидах образуются ВБИ и по нуклеопротеидам мигрируют в клеточных структурах, содержащих их. Учитывая сложные взаимодействия белков ДНК и РНК в процессе совместного действия ПИ и ВБИ, когда в конечном счете все выходит на нуклеопротеиды, и не случайно генетик Н. К. Кольцов в 1925 г. уделял белкам (скорее, нуклеопротеидам) большое внимание. При этом время миграции ВБИ максимально составляет, по нашим данным, 6 ч. Миграция ВБИ осуществляется в клетке с использованием жесткого скелета связи электронов стационарных атомных орбит С, N, O, S и P, которые и составляют матрицу цитоскелета нуклеопротеида. Высвечивание и миграция ВБИ происходят через посредство делокализованных π -электронов в подвижной системе с сопряженными связями, которые встраиваются по всему скелету жестких σ -локализованных связей. При этом нами показано, что десятикратное снижение ВБИ (по сравнению с контролем) уменьшает деление популяции старых клеток на 60 %. Реликтоэкология, как в случае обоснования ста-

ционарных орбит электронов атомов, объясняет подобно и постоянство мембранного клеточного потенциала. В действительности, как показали расчеты Г. Линга (2008) для нормального обмена ионами кальция и натрия между клеткой и средой насосу требуется в несколько тысяч раз больше энергии, чем клетка способна произвести. И это достигается повышением эффективности использования затраченной энергии резонанса, равной как раз величине 10^4 .

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ЭКЗО- И ЭНДОЦИТОЗА СИНАПТИЧЕСКИХ ВЕЗИКУЛ В НЕРВНОМ ОКОНЧАНИИ МЫШИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ. © О. В. Яковлева, Л. Д. Дмитриева, Е. А. Дюкова, Г. Ф. Ситдикова. Казанский федеральный университет, a-olay@yandex.ru.

Сахарный диабет — хроническое заболевание эндокринной системы человека, характеризующееся длительным повышением концентрации глюкозы в крови и сопутствующими изменениями процесса обмена веществ. Одним из серьезных осложнений при сахарном диабете являются периферические невропатии, которые характеризуются мышечной слабостью уменьшением чувствительности, параличами и атрофией. Данные симптомы могут быть вызваны как нарушением на уровне спинного мозга, так и изменениями в нервно-мышечном синапсе и в мышечной ткани (Moreo et al., 1995; Mizisin et al., 2007; Gaspar et al., 2010). Целью данной работы являлось исследование процесса рециклизации синаптических везикул (СВ) в нервном окончании мышцы при экспериментальном сахарном диабете.

Эксперименты проводили на нервно-мышечных препаратах диафрагмальной мышцы с использованием флуоресцентного красителя FM 1—43 (4 мкМ), который связывается с пресинаптической мембраной и во время эндоцитоза оказывается внутри вновь образующихся СВ, при этом появляется характерное свечение нервного окончания («загрузка»). Двигательный нерв стимулировали в течение 1 мин с частотой 50 Гц и использовали три протокола загрузки, когда FM 1-43 присутствовал в растворе: 1) 1 мин во время стимуляции, 2) 7 мин после ее окончания, 3) 1 мин во время стимуляции и 7 мин после. В норме в первом случае свечение терминалей составило 85 ± 3 о. е. ($n = 143$), во втором — 56 ± 1 о. е. ($n = 119$), в третьем — 87 ± 3 о. е. ($n = 121$).

Для создания модели сахарного диабета мышам после 1-суточного голодания внутрибрюшинно вводили аллоксан (100—150 мг/кг, $n = 15$). Мышам контрольной группы вводили физиологический раствор ($n = 10$). Начальный уровень глюкозы у мышей составлял 4 ± 2 мМ/л. Через 10—20 сут у животных с моделью сахарного диабета наблюдалось значительное увеличение уровня глюкозы в крови. На 45-е сут животных с повышенным уровнем глюкозы (>9 мМ/л) выводили из опыта. Забор осуществляли из хвостовой вены, изменения производили глюкометром «Accu-Chek Active».

У животных контрольной группы интенсивность свечения терминалей не отличалась от нормы. У животных с экспериментальным сахарным диабетом свечение терминалей при загрузке красителя в соответствии с первым протоколом составило 105 ± 4 о. е. ($n = 80$, $P < 0.05$), со вторым — не отличалось от нормы, с третьим — 95 ± 3 о. е. ($n = 75$, $P < 0.05$).

Для анализа процесса экзоцитоза СВ предварительно загруженные нервные терминалы (в соответствии с протоколом 3) раздражали с частотой 50 Гц в течение 20 мин и наблюдали снижение интенсивности свечения («выгрузка» красителя). В норме в первые 1—3 мин происходит быстрое обесцвечивание терминалей, и к 20-й мин свечение терминалей составляет 24 ± 4 % от начального. У контрольной группы животных динамика экзоцитоза не отличалась от нормы. В условиях экспериментального сахарного диабета обесцвечивание нервных терминалей происходило быстрее, и к 20-й мин свечение терминалей составляло 16 ± 3 %.

Полученные данные указывают на то, что в условиях моделирования сахарного диабета в двигательном нервном окончании мышцы происходит усиление процессов как экзо-, так и эндоцитоза СВ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00748) и гранта К. Цейсс.

НАВИГАЦИОННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, ИХ РОЛЬ В РЕГУЛЯЦИИ ПРОНИЦАЕМОСТИ ЭНДОТЕЛИЯ, РОСТЕ СОСУДОВ И НЕРВОВ. © В. А. Ткачук, Е. В. Семина, К. А. Рубина, В. Ю. Сысоева, Н. И. Калинина, Е. В. Парфенова. Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

Известно, что клетки мигрируют по градиенту хемоаттрактанта по заданным траекториям, которые определяют навигационные рецепторы. Нами было показано, что урокиназная система, состоящая из урокиназы (uPA) и рецептора uPAR, вовлечена в регуляцию направленной адгезии и миграции клеток за счет локального протеолиза внеклеточного матрикса на переднем крае мигрирующей клетки.

Урокиназа независимо от своей протеолитической активности может вызывать активацию внутриклеточной сигнализации, что приводит к изменению организации цитоскелета, адгезии и миграции клеток. Сигнальные эффекты урокиназы опосредует рецептор uPAR, являющийся ГФИ-заякоренным белком. uPAR обладает высокой подвижностью в мембране; при миграции происходит кластеризация uPAR на лидирующем крае клетки, что обеспечивает векторное перемещение клетки по градиенту хемоаттрактанта.

В докладе будет освещена роль белков-партнеров, опосредующих передачу сигнала при связывании uPA с uPAR. Интегрины являются представителями таких белков; при взаимодействии рецептора урокиназы uPAR с интегринными активируется внутриклеточная сигнализация, характерная для интегринов. Урокиназа также взаимодействует с рецептором липопротеинов низкой плотности LRP/ α 2-MR и рецептором липопротеинов очень низкой плотности VLDLR, при этом активируется внутриклеточная сигнализация с участием тирозинкиназ, ответственных за хемотаксис. В нашей лаборатории было обнаружено, что урокиназа способна активировать транскрипцию генов через белки STAT-1 и STAT-2, ответственные за рост, выживаемость и дифференцировку клеток. Кроме того, урокиназа, взаимодействуя с нуклеолином, способна трансллоцироваться в ядро и активировать транскрипцию гена α -актина, что вызывает трансдифференцировку фибробластов в миофибробласты.

В последнее время накапливаются данные о другом представителе ГФИ-заякоренных белков — Т-кадгерине, который участвует в активации внутриклеточной сигнализации, миграции и пролиферации клеток. Т-кадгерин — навигационный рецептор, негативно регулирующий прорастание аксонов в эмбриогенезе. Нами было показано, что Т-кадгерин ингибирует ангиогенез за счет подавления миграции эндотелиальных клеток, в основе которого лежит гомофильное взаимодействие между молекулами Т-кадгерина, экспрессированных на эндотелиальных клетках и клетках стромы.

Далее мы обнаружили, что в стабильных сосудах Т-кадгерин регулирует проницаемость эндотелия: ги-

перэкспрессия Т-кадгерина в клетках эндотелия сопровождается увеличением его проницаемости. Увеличение экспрессии Т-кадгерина вызывает активацию RhoA/Rac1/Cdc42 ГТФаз, их посредников ROCK, PAK и LIMK и перестройку актинового и тубулинового цитоскелета. Гиперэкспрессия Т-кадгерина разрушает VE-кадгериновые контакты с формированием межклеточных щелей в зоне адгезии, увеличивает тирозинное фосфорилирование VE-кадгерина по участку связывания с бета-катенином, разрушает связь катенинов с цитоскелетом и дестабилизирует адгезивные контакты. В результате происходит эндцитоз VE-кадгерина с последующей деградацией в лизосомах.