

**ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ И СООБЩЕНИЙ,
ПРЕДСТАВЛЕННЫХ НА I ВСЕРОССИЙСКУЮ КОНФЕРЕНЦИЮ
«ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ, ТРАНСПОРТ, ЦИТОСКЕЛЕТ»**

(Санкт-Петербург, 11—13 октября 2011 г.)

ПРЕСИНАПТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ NMDA СВЯЗАНО С ВНУТРИКЛЕТОЧНЫМ КАЛЬЦИЕМ И МОДУЛИРУЕТСЯ УБАИНОМ. © П. А. Абушик,¹ Д. А. Сибаров, А. Е. Большаков,¹ И. И. Кривой,² С. М. Антонов.¹ ¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН и ² С.-Петербургский государственный университет.

Избыток N-метил-D-аспартата (NMDA), избирательного агониста ионотропных рецепторов глутамата NMDA-типа, оказывает на нейроны токсическое действие, обусловленное накоплением кальция в клетках. Ранее нами показано, что субнанолярные концентрации убаина, не влияющие на активность Na,K-АТФазы, предотвращают нейротоксическое действие высоких концентраций NMDA, препятствуя развитию апоптоза (Антонов и др., 2009). С целью анализа механизма антиапоптотического действия убаина нами исследованы динамика внутриклеточного Ca²⁺-сигнала и частоты спонтанных возбуждающих синаптических токов (сВПСТ) при воздействии 30 мкМ NMDA, а также влияние 1 нМ убаина на эти процессы. Опыты проводили на первичной культуре нейронов коры мозга крыс (7—14 DIV). Регистрацию электрической активности нейронов осуществляли методом patch-clamp в конфигурации «целая клетка». При потенциале покоя — 70 мВ в контроле частота сВПСТ составляла $0.18 \pm 0.17 \text{ с}^{-1}$. Апликация 30 мкМ NMDA (с добавкой 30 мкМ глицина в качестве коагониста NMDA-рецепторов) приводила к достоверному ($P < 0.05$) увеличению входящего тока (на 80—300 пА) и частоты сВПСТ до $4.9 \pm 1.4 \text{ с}^{-1}$. Добавление 1 нМ убаина на фоне действия NMDA не сопровождалось изменением входящего тока, но приводило к существенному падению частоты сВПСТ до уровня, не отличающегося от контрольного. Внутриклеточную концентрацию Ca²⁺ измеряли с помощью флуоресцентных зондов Fluo-3 и Fura-2. При действии 30 мкМ NMDA развивался устойчивый Ca²⁺-сигнал, который быстро достигал плато, на уровне которого сохранялся в течение 40 мин регистрации. Концентрация внутриклеточного Ca²⁺ достигала 500—800 нМ. Совместная апликация 30 мкМ NMDA и 1 нМ убаина также приводила к развитию начального Ca²⁺-ответа, который, однако, спадал до контрольного уровня к 30-й мин регистрации при 30—50 нМ убаина.

Данные, полученные с применением обоих подходов, могут быть интерпретированы исходя из предположения о том, что Na,K-АТФаза при связывании убаина в нанолярных концентрациях вовлекается в процесс регуляции внутриклеточного Ca²⁺, что препятствует длительному накоплению Ca²⁺ при действии NMDA и как следствие — увеличению частоты сВПСТ. Предположительно таким может быть механизм антиапоптотического действия убаина, защищающий нейроны от гипервозбуждения, связанного с чрезмерной синаптической активностью нервной сети в NMDA-модели эксайтотоксичности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 10-04-00970 и 11-04-00397), а также средств тематического плана НИР СПбГУ № 1.37.118.2011.

РОЛЬ МИКРОТРУБОЧЕК В ОСУЩЕСТВЛЕНИИ БАРЬЕРНОЙ ФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ. © И. Б. Алиева,^{1–3} А. Д. Верин.³ ¹ Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, ² Российский университет дружбы народов, Москва, и ³ Центр сосудистой биологии Университета наук о здоровье Джорджии, Агаста, Джорджия, США, irina_alieva@belozersky.msu.ru.

Слой эндотелиальных клеток, выстилающий внутреннюю поверхность сосудов, представляет собой селективный проницаемый барьер между кровью и внутренним пространством всех органов. Главной функцией эндотелиальных клеток является регуляция проницаемости сосудистой стенки и контроль за обменом веществ между циркулирующей кровью и тканевой жидкостью; эндотелий регулирует транспорт макромолекул и движение клеток крови сквозь стенку сосуда. Поддержание барьерной функции обеспечивается равновесием внутриклеточных сокращающих и растягивающих сил, генерируемых белками цитоскелета. Реорганизация цитоскелета приводит к изменению клеточной поверхности и как следствие — к усилению или ослаблению барьерной функции. Нарушение барьерной функции — дисфункция эндотелиального пласта — характеризуется значительной перестройкой цитоскелета клеток, активацией актомиозинового сокращения и в конечном итоге образованием промежутков между эндотелиальными клетками.

Публикуется в дополнение к тезисам, опубликованным в № 9 за 2011 г.

Согласно полученным нами данным, каскад морфологических изменений, сопровождающих барьерную дисфункцию, начинается с деполимеризации периферических микротрубочек. Для того чтобы понять, какой вклад вносят микротрубочки в динамическую реорганизацию цитоскелета эндотелиальной клетки, была предложена физиологически адекватная клеточная модель, в которой клетки эндотелия экспрессируют EB3-GFP — белок, который связывается с плюс-концами микротрубочек. Используя данную модель, мы получили возможность описать ключевые параметры организации микротрубочек в эндотелиальных клетках, в том числе соотношение между субпопуляциями стабильных и динамичных микротрубочек. Используя модель, измеряли скорости роста микротрубочек в районе центросомы и на периферии как одиночных эндотелиоцитов, так и клеток, растущих в монослое. Было показано, что в норме большинство микротрубочек в клетках эндотелия динамичны, скорость роста их плюс-концов наиболее высока во внутренней цитоплазме, в районе центросомы. Скорость роста плюс-концов микротрубочек снижается от клеточного центра к периферии. Возможно, в клетках эндотелия существует механизм(ы) локальной регуляции роста плюс-конца микротрубочек. Скорость роста микротрубочек во внутренней цитоплазме эндотелиоцитов, растущих в монослое, ниже, чем в одиночных клетках, что позволяет предположить регуляторный эффект межклеточных контактов. Анализ распределения скоростей роста центросомальных микротрубочек в одиночных клетках эндотелия позволил выявить субпопуляции микротрубочек с высокой (втрое превышающей нормальную) скоростью роста, возможно, являющихся аналогом описанных ранее «пионерских» микротрубочек. При развитии барьерной дисфункции динамика микротрубочек изменяется, скорость роста их плюс-концов на периферии клетки снижается вдвое. Полученные результаты демонстрируют функциональное взаимодействие между микротрубочками и межклеточными контактами: динамичные микротрубочки, по-видимому, способны регулировать существующие контакты и, таким образом, влиять на эндотелиальную проницаемость.

Работа выполнена при финансовой поддержке НИН (HL 067307, HL080675) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00363).

БАКТЕРИАЛЬНАЯ ИНВАЗИЯ КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЛИЯНИЯ АНТИОКСИДАНТОВ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА И α -ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТЫ НА ТРАНСФОРМИРОВАННЫЕ КЛЕТКИ. © *Е. С. Божоккина, Е. А. Вахромова, И. А. Гамалей, С. Ю. Хайтлина.* Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, bozhokina@yahoo.com.

Опухолевая трансформация клеток характеризуется многочисленными изменениями фенотипа. Изменение фенотипа, в свою очередь, делает клетку более уязвимой для некоторых факторов, чувствительность к которым была гораздо меньше до трансформации. Одним из функциональных нарушений вследствие трансформации является изменение чувствительности клетки к бактериальной инвазии (Velge et al., 1997; Gamaley et al., 2006). Показано, в частности, что инвазия бактерий усиливается при трансфекции клеток большим Т-антигеном вируса SV 40, образуются постоянные клеточные линии с восприимчивым к

инвазии фенотипом (Velge et al., 1997). С другой стороны, чувствительность клеток 3T3-SV40 к инвазии уменьшается после обработки клеток антиоксидантом N-ацетилцистеином (NAC), приводящей к частичной реверсии трансформированного фенотипа (Gamaley et al., 2006). Эти изменения коррелируют с уменьшением чувствительности клетки к натуральным киллерам (Филатова и др., 2006, 2008). Таким образом, чувствительность культивируемых эукариотических клеток к бактериальной инвазии является маркером процессов, происходящих в клетке при действии антиоксидантов, что позволяет использовать бактериальную инвазию как для выяснения механизмов действия антиоксидантов, так и для выявления факторов, способствующих инвазии. В настоящей работе исследовали способность антиоксидантов N-ацетилцистеина (NAC) и α -липоевой кислоты изменять фенотипические свойства трансформированных клеток линии HeLa и их чувствительность к инвазии бактерий, продуцентов металлопротеаз. Установлено, что бактерии *S. grimesii* 30063 и рекомбинантные *E. coli* K-12, продуценты металлопротеазы гримелизина, инвазировали не более 10% клеток линии HeLa, как исходных, так и трансфицированных ГТФазами GFP-RhoA и GFP-RhoC. Инкубация клеток HeLa с NAC (10—20 мМ) или α -липоевой кислотой (0.6 мМ) увеличивала их чувствительность к инвазии бактерий в 2 и 3.5 раза соответственно. При инкубации клеток с 2.5 мМ NAC или 1.2 мМ α -липоевой кислотой бактериальная инвазия в клетки линии HeLa не отличалась от контроля. Увеличение инвазивности коррелировало с разрушением монослоя, значительной реорганизацией цитоскелета и отсутствием филаментов, актин был сосредоточен преимущественно в кортикальном слое. Кроме того, усиливалась экспрессия ГТФаз Rho в трансфицированных клетках. После удаления антиоксидантов из среды наблюдалось восстановление стресс-фибрилл, и цитоскелет клеток не отличался от цитоскелета контрольных клеток. Чувствительность клеток к бактериям была сопоставима с чувствительностью не обработанных антиоксидантами клеток.

Полученные данные свидетельствуют о том, что изменение чувствительности клеток HeLa к инвазии бактериями, синтезирующими металлопротеазы, коррелирует с реорганизацией цитоскелета: разборка цитоскелета сопровождается увеличением инвазивности клеток, а восстановление цитоскелета — с ее уменьшением. Однако необходимы дальнейшие исследования, чтобы выяснить, связано ли изменение чувствительности к инвазии с перестройками цитоскелета или эти процессы регулируются независимо друг от друга.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 11-04-0039 и 09-04-00467) и программы РАН «Молекулярная и клеточная биология».

РАСТИТЕЛЬНЫЕ ГОРМОНЫ ВЫЗЫВАЮТ ИЗМЕНЕНИЯ СОСТОЯНИЯ ЭПР И АППАРАТА ГОЛЬДЖИ В НОРМАЛЬНЫХ И ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА. © *М. Вильданова, Г. Онищенко, Е. Смирнова.* Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

Растительные гормоны — вещества, выделяемые клетками растений и действующие в низкой concentra-

ции как регуляторы роста и дифференцировки растений. Они сгруппированы по физиологическому эффекту, проявляемому у растений, и по общему химическому строению. Жасмоновая кислота (ЖК) участвует в ответе на повреждение и внедрение патогена. Абсцизовая кислота (АБК) участвует в регуляции процессов перехода в состояние покоя в ответ на абиотический стресс. Гиббереллиновая кислота (ГК) является стимулятором вегетативного роста. Целью работы было изучение реакции нормальных и трансформированных клеток кожи человека на действие трех разнонаправленных растительных гормонов — ЖК, АБК и ГК. В качестве объектов исследования использовали культивируемые клетки эпидермоидной карциномы А431 и нормальные кератиноциты HaCaT. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста через 24 ч инкубации клеток в присутствии разных концентраций растительных гормонов.

Анализ данных показал, что ЖК в концентрации 2 мМ вызывала гибель около 30 % популяции клеток А431 и HaCaT, АБК и ГК в концентрации 2 мМ вызывали незначительную гибель в культуре А431 и не оказывали влияния на клетки HaCaT. Следовательно, растительные гормоны в концентрации 2 мМ снижали выживаемость трансформированных клеток, и только ЖК снижала выживаемость нормальных клеток. Для того чтобы определить механизм гибели клеток, необходимо установить, какие нарушения вызывают растительные гормоны в клетках и какие органеллы являются мишенями их действия. В связи с этим было проведено иммуноцитохимическое исследование структурно-функционального состояния разных клеточных органелл.

Показано, что при концентрации 2 мМ ЖК, АБК и ГК не оказывали заметного влияния на микротрубочки, активные филаменты и митохондрии обеих клеточных линий. Однако все три агента вызывали значительные изменения в организации и состоянии вакуолярной системы (ЭПР, аппарата Гольджи, лизосом) как нормальных, так и трансформированных клеток. Использование антител к резидентным белкам ЭПР HDEL выявило расширение сети ЭПР при действии ЖК и АБК в клетках А431 и при действии всех трех гормонов в клетках HaCaT. Использование антител к белку p58K мембран аппарата Гольджи (АГ) выявило изменения морфологии и размеров АГ. В клетках А431 при действии ЖК площадь АГ увеличивалась в 1.6 раза, при действии АБК — в 3 раза, при действии ГК — в 2.5 раза. В клетках HaCaT площадь АГ при действии ЖК увеличивается в 1.6 раза, при действии АБК — в 8 раз, а при действии ГК площадь АГ значительно не изменялась. Выявление везикул кислого компартмента с помощью акридинового оранжевого показало, что значительные изменения этого компонента вакуолярной системы наблюдали только при действии АБК на клетки HaCaT, в которых в отличие от контрольных клеток были обнаружены гигантские везикулы.

Сопоставление реакции нормальных и трансформированных клеток кожи человека на действие разнонаправленных растительных гормонов показало, что в концентрации 2 мМ данные растительные гормоны являются цитотоксичными для трансформированных клеток, и только ЖК является цитотоксичной как для нормальных, так и для трансформированных клеток. Независимо от действия, которое оказывают растительные гормоны на выживаемость клеток, все они вызывают изменения в состоянии вакуолярной системы. Изменения вакуолярной системы могут свидетельствовать о том, что: 1) механизм

гибели клеток связан со стрессом ЭПР; 2) в клетках происходит активация синтетических процессов; 3) нарушается секреция белков из АГ.

ВЛИЯНИЕ НЕГИДРОЛИЗУЕМОГО АНАЛОГА ГТФ НА СТИМУЛИРОВАННОЕ ГТФ ОСВОБОЖДЕНИЕ Ca^{2+} ИЗ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ДЕПО ООЦИТОВ СВИНЕЙ.
© В. Ю. Денисенко, Т. И. Кузьмина. Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных РАСХН, Санкт-Петербург—Пушкин, prof.kouzmina@mail.ru.

Показано (Henne, Soling, 1986), что освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо при действии ГТФ связано с гидролизом фосфатного остатка на ГТФ, и сделано предположение (Mullaney et al., 1987) о том, что ГТФ образует связь между различными внутриклеточными депо кальция (чувствительными к IP_3 и риаинодину) и опосредует переход Ca^{2+} между этими депо. Цель настоящего исследования — идентификация путей реализации действия ГТФ при освобождении Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов свиней. В экспериментах использовали яйцники свиней на стадии фолликулярного роста без видимой патологии. Для опытов отбирали ооциты округлой формы с тонкогранулированной ооплазмой и равномерной по ширине зоной пеллюциды. Инкубацию выделенных ооцитов проводили в модифицированной среде Дюльбеко в отсутствие внеклеточного Ca^{2+} . Концентрацию Ca^{2+} внутриклеточных депо ооцитов свиней измеряли с помощью зонда хлортетрациклин (ХТЦ). Используемая концентрация ХТЦ составляла 40 мкМ. Интенсивность флуоресценции ХТЦ измеряли на флуориметрической установке, состоящей из люминесцентного микроскопа и фотометрической насадки. Комплекс ХТЦ— Ca^{2+} —мембрана возбуждали светом 380—400 нм, флуоресценцию регистрировали в области 530 нм. Интенсивность флуоресценции измеряли в усл. ед.

Установлено, что добавление ГТФ в концентрации 10 мкМ стимулирует в ооцитах освобождение из внутриклеточных депо. Использование ГТФ γ S (негидролизуемого аналога ГТФ) позволяет выявить необходимость гидролиза при освобождении Ca^{2+} из внутриклеточных депо, стимулированного добавлением ГТФ. При гидролизе ГТФ происходит образование ГДФ, который при участии определенных ферментов восстанавливается обратно до ГТФ. Для предотвращения восстановления ГТФ на всех этапах экспериментов добавляли АДФ в концентрации 1 мМ. При использовании одного ГТФ γ S в концентрации 100 мкМ в ооцитах не отмечали освобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Отсутствовал выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо при совместном действии ГТФ и ГТФ γ S, что позволяет предположить необходимость гидролиза при освобождении Ca^{2+} из внутриклеточных депо под действием ГТФ. Внесение в среду инкубации СТГ в концентрации 10 нг/мл приводило к освобождению Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов. При совместном действии СТГ и ГТФ в клетках отмечали дополнительный выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо. В соответствии с гипотезой этот дополнительный выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо связан со способностью ГТФ образовывать связь между различными внутриклеточными депо Ca^{2+} и обеспечивать переход Ca^{2+} между ними (Mullaney et al., 1987). Если на освобождение Ca^{2+} , стимулированное использованием одного ГТФ, добавление ГТФ γ S оказывало

ингибирующее воздействие, то активированное при совместном действии СТГ и ГТФ дополнительное освобождение Ca^{2+} не ингибировалось при внесении в среду инкубации ГТФγS. Из этого следует, что гидролиз терминального остатка ГТФ детерминирует мобилизацию кальция из внутриклеточных депо, а для обеспечения связи между ними возможно вовлечение элементов цитоскелета.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-4-00389).

СТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ РАЗЛИЧИЯ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ИЗОФОРМ АКТИНА В НЕМЫШЕЧНЫХ КЛЕТКАХ. © В. Б. Дугина. Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

Актины, особенно плазматические или немыечные изоформы, играют ведущую роль в ключевых клеточных процессах, таких как адгезия, миграция, поляризация и деление клеток. Используя специфические моноклональные антитела, полученные проф. К. Шапонье (Университет г. Женева), мы исследовали распределение бета- и гамма-цитоплазматических актинов в фибробластах и эпителиальных клетках. С помощью лазерной конфокальной микроскопии мы показали, что бета-актин преимущественно локализован в филоподиях, стресс-фибриллах, кольцевых пучках и адгезионных межклеточных контактах, что предполагает роль этой изоформы в клеточной адгезии и сокращении. Напротив, гамма-актин организован по-разному в зависимости от клеточной активности: в виде кортикальных и ламеллиподиальных сетей в движущихся клетках, что предполагает его важную роль в клеточной подвижности; в стационарных клетках гамма-актин также может быть локализован в стресс-фибриллах. Эксперименты по ингибированию малых ГТФаз продемонстрировали, что бета- и гамма-актиновые структуры находятся под контролем RhoA и Rac1 соответственно.

Исследование функций изоформ проводили с помощью специфического уменьшения экспрессии бета- и гамма-актинов РНК-интерференционным методом. Клетки, трансфицированные малыми интерферирующими РНК, избирательно подавляющими экспрессию бета- или гамма-актина, имели выраженные морфологические различия: при уменьшении экспрессии бета-актина клетки хорошо распластывались и теряли бета-актиновые пучки; напротив, при уменьшении экспрессии гамма-актина клетки приобретали сократимый фенотип с толстыми пучками актина без ламеллиподиальных структур. Более того, уменьшение экспрессии каждой из изоформ актина по-разному влияло на движение, подтверждая их специфические роли в клеточной подвижности. Также получены данные о различной роли этих изоформ в клеточном делении. Наши результаты выявили принципиально новые аспекты организации изоформ актина, предполагающие их функциональные различия.

Дополнительные данные о различной роли изоформ актина в миграции клеток были получены из сравнительного изучения распределения бета- и гамма-актиновых структур в нормальных и трансформированных клетках. Наши результаты показали, что трансформированные клетки теряют бета-содержащие актиновые пучки, но в

них выявляются хорошо развитые гамма-актиновые сети. Основное свойство клеточной трансформации состоит в реорганизации актин-миозинового цитоскелета, ведущей к измененной клеточной подвижности и инвазии. Многочисленными исследованиями было показано исчезновение стресс-фибрилл в трансформированных клетках, но, помимо наших данных, очень мало было известно о специфическом изменении актиновых изоформ при онкогенной трансформации. Мы сравнили организацию цитоплазматических актинов у фибробластов из нормальных эмбриональных легочных линий WI38 и MRC-5 человека с их SV40-трансформированными опухолеродными производными WI38-VA13 и MRC-5V2. Трансформированные клетки отличались от нормальных редукцией бета-актиновых пучков и развитием кортикальных и ламеллиподиальных гамма-актиновых протрузий. Мы проверили, ведет ли подобная морфологическая реорганизация цитоскелета к количественной вариации в экспрессии этих изоформ. Количественную оценку экспрессии провели с помощью анализа соотношения изоформ с помощью двумерного электрофореза. Результаты показали возможную связь клеточной трансформации с реорганизацией цитоплазматических изоформ актина и модуляциями в их экспрессии.

АНАЛИЗ ПРОЦЕССОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ И КОНЕЧНЫХ СТАДИЙ АПОПТОЗА У ТРАНСГЕННЫХ ЭМБРИОНОВ ВЬЮНОВ ПРИ МОЗАИЧНОМ ПАТТЕРНЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *GFP*. © Л. В. Козикова,¹ И. В. Макарова,² Н. В. Хайдарова,² Л. А. Слепцова,³ Л. Е. Андреева.² ¹ Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных РАСХН, Санкт-Петербург—Пушкин, ² Институт молекулярной генетики РАН, Москва, и ³ Международный биотехнологический центр Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, larkozik@list.ru; leandr1@yandex.ru.

Репортерный ген *GFP* широко используется в экспериментах по трансгенезу и является удобным прижизненным маркером экспрессии различных трансгенных конструкций (Tsang, 2010). Целью настоящей работы была оценка гомеостаза трансгенных организмов в процессе эмбриогенеза при мозаичном паттерне экспрессии гена *GFP* в эмбрионах вьюнов *Misgurnus fossilis* L. Трансгенных эмбрионов вьюнов получали методом микроинъекции плазмиды pCEEGFP в область бластодиска оплодотворенных икринок. Контролем служили интактные зародыши и эмбрионы рыб, которым вводили дистиллированную воду. Экспрессию *GFP* выявляли в эмбрионах вьюна в течение 1—4 сут по флуоресценции клеток в зеленой области спектра с использованием флуоресцентного микроскопа ZEISS Stereo Lumar V.12 и фильтра для ФИТЦ. После дехорионизации 4-суточных эмбрионов с транзитной экспрессией гена *GFP* были получены цитологические препараты для микроскопического анализа процессов пролиферации и конечных стадий апоптоза. Обработку материала проводили в соответствии с описанной методикой (Walker, 2000) в авторской модификации. У экспериментальных зародышей в большей доле случаев наблюдалась аномалия развития по сравнению с контрольной группой.

На цитологических препаратах 4-суточных зародышей проводили анализ пролиферации и апоптоза по коли-

честву делящихся и пикнотических клеток соответственно. В контроле количество пролиферирующих клеток (М) составило $3.42 \pm 0.12\%$, а количество пикнотических (П) — $1.74 \pm 0.16\%$. После введения дистиллированной воды достоверной разницы между инъекрованными и интактными зародышами по митозам ($M = 3.36 \pm 0.05\%$) и пикнозам ($P = 1.55 \pm 0.04\%$) не обнаружено, что указывает на то, что сам процесс микроинъекции не оказывает негативного влияния на пролиферативную активность клеток и апоптоз. Количество пикнотических клеток у аномальных трансгенных эмбрионов с геном *GFP* ($P = 2.89 \pm 0.27\%$) по сравнению с нормальными трансгенными зародышами с этим же геном ($P = 2.01 \pm 0.22\%$) увеличивалось ($P < 0.01$), что указывает на активацию процессов запрограммированной клеточной смерти при нарушениях эмбриогенеза. При сравнении показателей пролиферативной активности и апоптоза у нормальных эмбрионов, которым инъекцировали дистиллированную воду ($M = 3.36 \pm 0.05\%$; $P = 1.55 \pm 0.04\%$), и нормальных эмбрионов с *GFP* ($M = 2.62 \pm 0.16\%$; $P = 2.01 \pm 0.22\%$) была выявлена достоверная разница по обоим показателям. Показаны уменьшение количества митотических ($P < 0.05$) клеток и увеличение числа пикнотических клеток ($P < 0.001$).

Таким образом, цитологический анализ учета митотических и пикнотических клеток у эмбрионов с экспрессией трансгенов позволяет понять координацию важнейших процессов в клетках в ходе эмбриогенеза.

АКТИНОВЫЙ ЦИТОСКЕЛЕТ В РАСТУЩИХ И ЗАВЕРШИВШИХ ФАЗУ РОСТА ООЦИТАХ КОРОВ.
© Т. И. Кузьмина, О. С. Скотти. Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных РАСХН, Санкт-Петербург—Пушкин, prof.kouzmina@mail.ru.

Приобретение женской гаметой компетентности к оплодотворению и развитию эмбрионов — важный этап технологии получения эмбрионов животных *in vitro*. Популяция донорских ооцитов, используемых в клеточных репродуктивных технологиях, различается потенциальными к экстракорпоральному созреванию и способностью к развитию из них биологически полноценных эмбрионов (Alm et al., 2005). Разработка эффективных метаболических тестов раннего прогнозирования качества ооцитов позволит увеличить эффективность репродуктивных технологий. Селекцию клеток и их культивирование проводили в соответствии с методами, разработанными в лаборатории биологии развития ГНУ ВНИИГРЖ (Кузьмина и др., 2009). Применение в качестве зонда для прижизненного тестирования ооцитов бриллиантового кристаллического красителя (BCB — brilliant cresyl blue) — индикатора активности глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы (G6PDH) — обеспечивает возможность использования отобранных ооцитов для дальнейшего культивирования, их оплодотворения и получения эмбрионов. BCB детерминирует интрацеллюлярную активность G6PDH, которая играет важную роль в клеточном росте, являясь ключевым ферментом пентозофосфатного цикла. Активность фермента возрастает в растущем ооците (BCB(–)-ооциты, к моменту завершения роста его активность снижается (BCB(+)-ооциты). Ранее нами обнаружено, что при оплодотворении BCB(+)-ооцитов доля развившихся из них поздних морул и бластоцист достигает 38 %, что оказа-

лось выше ($P < 0.001$), чем в группе BCB(–)-ооцитов, где этот показатель составил 20 % (Heleil et al., 2010; Kuzmina et al., 2010). Анализ исходной популяции ооцитов коров из фолликулов разного диаметра показал, что наибольшее число BCB(–)-ооцитов находится в фолликулах диаметром 3–5 и более 5 мм (79 и 70 % соответственно). В фолликулах диаметром менее 3 мм доля BCB(+)-ооцитов составила 58 %.

Структура актинового цитоскелета влияет на важнейшие клеточные процессы, в том числе на обеспечение транспорта РНК, белков и цитоплазматических органелл. Незавершенность формирования актинового скелета, а также необходимость вовлечения элементов цитоскелета в завершение процессов, детерминирующих окончание роста женской гаметы, могут быть причинами низкой компетентности BCB(–)-ооцитов к дальнейшему созреванию *in vitro*. В связи с этим вызывают несомненный интерес сравнительные исследования архитектоники цитоскелета растущих и завершивших фазу роста ооцитов. Актиновый цитоскелет визуализировали окраской родамин-фаллоидином (R415, Invitrogen, США). Препараты анализировали на конфокальном сканирующем микроскопе. Для возбуждения флуоресценции использовали лазер с длиной волны 543 нм. Интенсивность флуоресценции фиксировали в усл. ед. Эксперименты по визуализации актинового скелета и измерению интенсивности флуоресценции проводили на базе Центра коллективного пользования Хромас (С.-Петербургский государственный университет). В результате проведенных экспериментов выявлены достоверные различия в интенсивности свечения родамин-фаллоидина в BCB(+)- и BCB(–)-ооцитах коров (22.6 против 53.3 усл. ед., $P < 0.001$, $n = 48$). Представленные результаты можно интерпретировать с учетом полученных нами данных о незавершенности роста BCB(–)-ооцитов, в которых происходят интенсивные синтетические процессы, затрагивающие реорганизацию и формирование клеточных компартментов, элементов цитоскелета.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-00389).

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СЕРИН/ТРЕОНИНОВОЙ ПРОТЕИНФОСФАТАЗЫ 5 С БЕЛКОВЫМ ПРОДУКТОМ ОПУХОЛЕВО-СУПРЕССОРНОГО ГЕНА *TSC2*.
© О. М. Маланчук, С. С. Пальчевский, В. В. Филоненко. Институт молекулярной биологии и генетики НАНУ, Киев, Украина, malanchook@ukr.net.

Изучение наследственных синдромов, которые приводят к образованию опухолей, помогает углубить современное понимание этапов развития рака, облегчая идентификацию ряда опухолево-супрессорных белков, которые выполняют важные функции в процессах регуляции роста и развития клеток в норме, гомеостазе тканей и в ответе на генетические повреждения. Одним из таких синдромов является туберозный склероз (TSC) — ауто-сомно-доминантное заболевание, для которого характерны нетипические опухолеподобные образования, гамартомы, которые возникают в широком спектре тканей и органов. Приблизительно две трети случаев TSC являются спорадическими и возникают вследствие мутаций в одном из двух опухолево-супрессорных генов — *TSC1* или

TSC2. Белковые продукты опухолево-супрессорных генов туберозно-склерозного комплекса — гамартин (TSC1) и туберин (TSC2) — образуют гетеродимерный туберозно-склерозный комплекс, в котором TSC1 стабилизирует TSC2 от убиквитинилирования и разрушения в протеасомах.

Опухолево-супрессорный комплекс TSC1—TSC2 является ключевым посредником в суммировании информации о ростовой стимуляции и подавляет чрезмерный клеточный рост через серин-треониновую протеинкиназу (ПК) mTOR. Регуляция активности туберозно-склерозного комплекса осуществляется за счет фосфорилирования несколькими ПК по крайней мере по пяти сайтам в TSC1 и одиннадцати сайтам в TSC2, причем если модификация одними ПК (AMPK, GSK3 β и REDD) вызывает активацию, то другие ПК (PKB, CDK1, IKK β , ERK и RSK1), напротив, подавляют функцию комплекса TSC1—TSC2. Однако мало что известно о регуляции комплекса со стороны протеинфосфатаз (ПФ).

Ранее методом двугибридной системы дрожжей нами было идентифицировано 10 TSC2-связывающих белков, среди которых была идентифицирована и серин/треониновая протеинфосфатаза 5 (PP5). Целью данного исследования было охарактеризовать специфичность взаимодействия между TSC2 и PP5. Для этого вначале специфичность образования комплекса TSC2—PP5 была продемонстрирована на модели клеток эмбриональных фибробластов мышей с помощью метода коиммунопреципитации. В результате впервые было показано, что эффективность взаимодействия TSC2 с PP5 зависит от физиологического состояния клеток, а именно: комплексообразование TSC2 и PP5 усиливается в активно пролиферирующих клетках. Кроме того, нам впервые удалось показать способность PP5 дефосфорилировать *in vitro* TSC2 по потенциальным сайтам фосфорилирования AMPK. Таким образом, в результате проведенных экспериментов нами предложена модель регуляции активности TSC2 путем PP5-опосредованного дефосфорилирования.

РЕГУЛЯТОРНОЕ ВЛИЯНИЕ ГЛУТОКСИМА НА ТРАНСПОРТ Na⁺ В КОЖЕ ЛЯГУШКИ. © А. В. Мельницкая, З. И. Крутецкая, О. Е. Лебедев, В. Г. Антонов. Кафедра биофизики С.-Петербургского государственного университета.

Кожа амфибий и другие изолированные эпителиальные системы являются классическими модельными объектами для исследования механизмов транспорта ионов через биологические мембраны. Транспорт Na⁺ в эпителиях — сложная, многокомпонентная система, различные белковые компоненты которой являются мишенью для окислительного стресса. Ранее нами было показано, что транспорт Na⁺ в коже лягушки модулируется окисляющими агентами, такими как цистамин, цистин, окисленный глутатион (GSSG) и его синтетический аналог препарат глутоксим® (ФАРМА-ВАМ, Москва). Впервые установлено, что приложение этих агентов к апикальной поверхности кожи лягушки снижает транспорт Na⁺. В то же время при добавлении окислителей со стороны базолатеральной поверхности кожи подавление транспорта Na⁺ сохраняется лишь при действии цистина и цистамина, тогда как GSSG и глутоксим имитируют эффект инсулина и стимулируют транспорт Na⁺. Влияние инсулина на транспорт

Na⁺ инициируется связыванием гормона с рецептором, локализованным в базолатеральной мембране эпителиальных клеток. Ранее нами было показано, что влияние инсулина на транспорт Na⁺ в коже лягушки зависит от тирозинкиназ и тирозинфосфатаз и осуществляется при участии фосфатидилинозитолкиназы (ФИ-киназы) и протеинкиназы С. Важную роль в сигнальных каскадах инсулина играют также элементы цитоскелета, опосредующие морфологические, метаболические и ядерные эффекты гормона. Кроме того, известно, что актиновые филаменты имеют высокую редокс-чувствительность и легко подвергаются S-глутатионилированию. В связи с этим представлялось целесообразным исследовать роль ФИ-киназы, тирозинкиназы, а также элементов актинового и тубулинового цитоскелета в регуляции глутоксимом транспорта Na⁺ в коже лягушки *Rana temporaria*. В экспериментах использовали два структурно различных ингибитора ФИ-киназы вортманнин и соединение LY 294002, ингибитор тирозинкиназы генистейн, деполимеризатор микрофиламентов цитохалазин D, стабилизатор микрофиламентов каликулин А и деполимеризатор микротрубочек нокодазол. Для регистрации вольт-амперных характеристик кожи лягушки использовали автоматизированную установку фиксации потенциала. Транспорт Na⁺ оценивали как амилорид-чувствительный ток короткого замыкания. Статистический анализ проводили с применением *t*-критерия Стьюдента.

Показано, что предварительная инкубация кожи лягушки с вортманнином (50 нМ и 1 мкМ), LY 294002 (100 и 200 нМ) или генистейном (100 мкМ) существенно снижает стимулирующее влияние 100 мкг/мл глутоксима на транспорт Na⁺. Предварительная обработка апикальной поверхности кожи цитохалазином D (20 мкг/мл) или каликулином А (25 нМ) также существенно снижает, а предварительная инкубация с нокодазолом (25 мкМ) практически полностью предотвращает стимулирующее влияние 100 мкг/мл глутоксима на транспорт Na⁺. Полученные результаты свидетельствуют о важной роли ФИ-киназы и тирозинкиназы в регуляторном влиянии глутоксима на транспорт Na⁺ в коже лягушки, а также о том, что любые изменения в структуре актинового и тубулинового цитоскелета приводят к снижению стимулирующего влияния глутоксима на транспорт Na⁺. На основании результатов настоящей работы и ранних работ можно предположить, что глутоксим может взаимодействовать с богатыми цистеином доменами рецептора инсулина в базолатеральной мембране эпителиальных клеток, вызывать его трансактивацию и запускать сигнальный каскад, включающий в себя тирозинкиназы, ФИ-киназы и элементы цитоскелета.

СИГНАЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИПОПОЛИСАХАРИДА В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ. © Р. Г. Парнова, С. Д. Николаева, В. Т. Бахтеева, Е. М. Фок, Т. М. Федотов, А. В. Бородкина, Е. А. Лаврова. © Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова, Санкт-Петербург, rimma_parnova@mail.ru.

Бактериальные липополисахариды (ЛПС), компоненты клеточной стенки грамотрицательных бактерий, опосредуют основные токсические эффекты данных патогенов на клетки эукариот. Известно, что в основе узнавания ЛПС и инициации неспецифического иммунного ответа в

клетках млекопитающих лежит чрезвычайно сложная сигнальная сеть, включающая в себя связывание ЛПС со специфическими рецепторами TLR4 и вовлечение большого количества адапторных белков (MAL, MyD88, TRAM и TRIF), меняющих активность протеинкиназ, что в конечном итоге приводит к усилению транскрипции провоспалительных генов.

В последнее время было показано, что системы распознавания ЛПС существуют не только в иммунокомпетентных, но и в различных других типах клеток. Используя в качестве модели изолированные эпителиальные клетки мочевого пузыря лягушки *R. temporaria*, мы обнаружили, что в данном типе клеток экспрессируются рецепторы TLR4. С использованием методов ОТ-ПЦР, иммуноблотинга и прямого измерения активности NO-синтазы нами показано, что под действием ЛПС стимулируется экспрессия мРНК и белка индуцибельной NO-синтазы (iNOS), что приводит к увеличению продукции NO, одного из важнейших медиаторов воспалительных реакций и неспецифического иммунного ответа клеток. Активация экспрессии iNOS сопровождалась усилением поступления аргинина в клетку, субстрата для синтеза NO, и тормозилась в присутствии ингибитора транскрипционного фактора NF-κB.

Наши данные показали, что действие ЛПС может сопровождаться изменением продукции простагландина E₂ (ПГЕ₂), другого важнейшего медиатора воспаления, однако эффекты ЛПС могут носить разнонаправленный характер, причины которого остаются малопонятными. Усиление синтеза ПГЕ₂ под действием ЛПС, по всей вероятности, обеспечивается активацией фосфолипазы A₂ и циклооксигеназы. Этот эффект ЛПС тормозился ингибиторами ERK1/2 и p38 MAP-киназ (UO126 и SB 203580 соответственно), а также вортманнином, ингибитором PI-3-киназы. Имеющиеся у нас данные по влиянию ПГЕ₂ на продукцию NO позволяют предположить, что ЛПС-стимулированный рост синтеза ПГЕ₂ цАМФ-зависимым механизмом обеспечивает дальнейшее усиление экспрессии iNOS.

Наблюдаемое снижение продукции ПГЕ₂ под действием ЛПС связано с эффектом бактериального стимула на усиление депонирования источника синтеза ПГЕ₂ — арахидоновой кислоты (АК) в липидные гранулы, что, по всей вероятности, приводит к снижению доступности субстрата для циклооксигеназы. Методами проточной цитометрии и конфокальной микроскопии нами показано, что гранулы присутствуют практически во всех клетках, а экзогенная АК увеличивает гранулярность клеток и среднюю интенсивность флуоресценции комплекса нильского красного с триацилглицеридами (ТАГ), что свидетельствует о включении АК в ТАГ липидных гранул. Инкубация клеток с [³H]-АК и последующий анализ липидных фракций показали, что 65 % экзогенной АК включается во фракцию ТАГ. ЛПС вызывал значительное увеличение включения экзогенной АК в ТАГ липидных гранул, что сопровождалось снижением продукции ПГЕ₂. Эти факты свидетельствуют о том, что ТАГ липидных гранул являются местом депонирования АК, предохраняя клетку от ее избытка в цитозоле, что обеспечивается, по всей вероятности, высокой активностью специфических ацилтрансфераз. Этот пул липидов чувствителен к действию ЛПС и может служить важным противовоспалительным механизмом, препятствующим увеличению синтеза простагландинов при действии бактериальных патогенов.

Полученные данные свидетельствуют о наличии в эпителиальных клетках мочевого пузыря лягушки механизмов распознавания бактериального ЛПС и сложной разветвленной системы внутриклеточной сигнализации, обеспечивающей реакции клетки в ответ на действие патогенов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы Министерства образования и науки РФ (проект 14.740.11.0918).

РОЛЬ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ В ЭФФЕКТАХ СЕРОВОДОРОДА НА АКТИВНОСТЬ КАЛЬЦИЙАКТИВИРУЕМЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ В КУЛЬТУРЕ G_{H3} КЛЕТОК КРЫСЫ. © Г. Ф. Сумдикова,¹ Т. М. Вейгер (Т. М. Weiger),² А. Херманн (А. Hermann).² ¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, и ² Университет г. Зальцбурга, Австрия.

Сероводород (H₂S) относится к классу газообразных посредников наряду с оксидом азота и монооксидом углерода, выполняя целый ряд физиологических функций. H₂S продуцируется эндогенно во многих типах клеток из L-цистеина с помощью ферментов цистатионин β-синтазы и цистатионин-γ-лиазы. H₂S модулирует нейрональную активность, вызывает расслабление гладкой мышцы, регулирует секрецию адренокортикотропного гормона из гипоталамуса и освобождение медиатора из двигательного нервного окончания. Мишенями действия H₂S являются ионные каналы, транспортеры и ферменты. Кальцийактивируемые калиевые каналы большой проводимости (BK) участвуют в регуляции целого ряда клеточных функций, таких как секреция гормонов и медиаторов, регуляция сосудистого тонуса и многие другие. Работа BK-каналов может модулироваться целым рядом внутри- и внеклеточных факторов, включая фосфорилирование и дефосфорилирование субъединиц канала, в том числе протеинкиназой C. Целью нашей работы было оценить эффекты H₂S на BK-каналы в культуре клеток G_{H3} и зависимость эффекта сероводорода от фосфорилирования канала протеинкиназой C. Эксперименты проводили на культуре гипофизарных клеток крысы G_{H3}, полученных из коллекции микроорганизмов и клеточных культур ФРГ. Регистрировали ионные токи в режимах отведения whole-cell и активность одиночных ионных каналов в конфигурации outside-out. Гидросульфид натрия (NaHS) использовали в качестве донора H₂S. Используемые реактивы получены из фирмы Sigma (Vienna, Австрия).

Аппликация донора H₂S NaHS в концентрации 300 мкМ во внеклеточный раствор приводила к значительному и обратимому усилению выходящих K-токов в режиме регистрации whole-cell. Внеклеточная аппликация тетраэтиламмония (ТЭА) (1 мМ), который блокирует BK-каналы в субмиллимолярных концентрациях, снижала выходящие токи и предотвращала действие NaHS. Подобное действие оказывал также ибериотоксин — специфический блокатор BK-каналов. В конфигурации outside-out регистрировали активность одиночных BK-каналов. Аппликация NaHS приводила к дозозависимому увеличению вероятности открытия (Po) каналов. Po BK-каналов при потенциале 60 мВ (концентрация свободного Ca²⁺ в пипетке 0.5 мкМ) в контроле составила 0.043 ± 0.007 (n = 11). Аппликация NaHS (300 мкМ) вызывала уве-

личение вероятности открытия одиночного канала до 0.084 ± 0.011 (213 ± 14 %) ($n = 11$, $P < 0.001$) и увеличение среднего времени открытого состояния от 1.83 ± 0.12 мс ($n = 11$) до 2.53 ± 0.37 мс ($n = 11$, $P < 0.001$) уже в течение первой минуты аппликации. Амплитуда токов одиночных каналов не изменилась. Эффект NaHS проявлялся в той же степени при наличии АТФ во внутриклеточном растворе, однако применение субъединицы протеинкиназы С в концентрации 20 мкМ полностью предотвращало развитие эффекта NaHS, и вероятность открытия каналов составила 107 ± 23 % ($n = 5$, $P < 0.05$). При этом в условиях ингибирования протеинкиназ стауроспорином (1 мкМ) эффект NaHS полностью сохранялся и составил 182 ± 19 % ($n = 4$, $P < 0.05$).

Таким образом, NaHS, донор H_2S , обратимо стимулирует Ca^{2+} -активируемые K^+ -токи в культуре гипофизарных клеток крысы GH3 и повышает вероятность открытого состояния BK-каналов. При этом эффект газа зависит от состояния фосфорилирования канала. В условиях фосфорилирования канала протеинкиназой С эффект газа не проявляется.

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

РОЛЬ ЯДЕРНОГО СКЕЛЕТА В ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ПРОЦЕССА РЕПЛИКАЦИИ ДНК.

© О. С. Стрелкова,^{1,2} С. Ю. Курчатова,¹ С. С. Абрамчук,³ И. Б. Алиева,^{1,4} И. И. Киреев.^{1,2} ¹ Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, ² Физический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова и ³ Российский университет дружбы народов, Москва.

Ядерный скелет, основным структурным компонентом которого является ядерная ламина, обеспечивает механическую прочность клеточного ядра, а также участвует в позиционировании хромосом внутри ядра при помощи, в частности, заякоривания специфических хромосомных локусов на ядерной периферии. Поскольку взаимодействие хромосом с ядерной оболочкой (ламиной) является неслучайным и коррелирует с транскрипционной активностью генов и таймингом репликации, возможная активная роль ламины в регуляции этих процессов представляется весьма вероятной. В частности, прочная связь хроматина с ламинной может создавать топологические проблемы при репликации периферического гетерохроматина, что в свою очередь требует временной диссоциации реплицирующегося хроматина от ядерной ламины для эффективной репликации. Действительно, исследование динамики внутриклеточной локализации искусственного гетерохроматического хромосомного локуса размером около 90 млн пар нуклеотидов, ассоциированного с ядерной оболочкой, в ходе клеточного цикла показало, что репликация данного локуса сопровождалась перемещением его внутрь ядра (Li et al., 1998). Поскольку в этой работе структурная организация и динамика периферического ядерного скелета в области прикрепления трансгенного локуса не были исследованы, в настоящей работе мы изучили корреляцию между изменениями в трехмерной организации ламины и перемещениями хромосомного локуса в S-фазных клетках, исполь-

зуя ту же модельную систему. Компактный гомогенно окрашенный хромосомный локус, содержащий tandemные повторы Lac-репрессора, выявлялся на периферии ядра, начиная с середины G₁-фазы до средней S-фазы. При этом трансгенный локус находился в тесном контакте с ядерной ламинной, что наблюдалось как на светооптическом, так и на ультраструктурном уровне. В середине синтетического периода локус деконденсировался и перемещался внутрь ядра, где происходила его репликация. В фазе G₂ реплицированный локус снова контактировал с ядерной периферией. При этом изменения положения данного хромосомного локуса и его декомпактизация сопровождалась изменениями в морфологии ламины, визуализируемой при помощи специфических антител либо при помощи экспрессии в данных клетках GFP- или mRFP-ламин. Декомпактизация искусственного хромосомного региона сопровождалась формированием глубоких инвагинаций ламины, при этом перемещающийся внутрь ядра хромосомный локус не терял с ней связи на всех стадиях этого процесса. Данные наблюдения свидетельствуют о высокой пластичности ламины в области прикрепления реплицирующегося хроматина, причем эта пластичность проявляется еще до начала собственно синтеза ДНК.

Сходный характер распределения ламин в клетках СНО, СНО_А03 и СПЭВ подтвердил, что присутствие в ядре искусственного хромосомного локуса не приводило к значительным изменениям в организации ламины. В клетках СПЭВ, СНО и СНО_А03 ламины были локализованы в периферической ламине и в инвагинациях, отходящих от периферической ламины внутрь ядра. Ламины А также были диффузно распределены в нуклеоплазме, за исключением области ядрышек, причем находились в полимерном состоянии, так как предобработка клеток тритоном до фиксации не приводила к вымыванию ламин. В составе ядерной оболочки ламины располагались не гомогенно: яркость свечения GFP-ламин или антител варьировала для разных участков ядерной оболочки, причем зоны повышенной концентрации ламин коррелировали с расположением масс конденсированного периферического хроматина. Детальный ультраструктурный анализ сайтов репликации, выявляемых при помощи экспрессии в клетках GFP-PCNA, с его последующей детекцией методом иммуоэлектронной микроскопии выявил локальное нарушение контактов между реплицирующимся хроматином и ядерной ламинной. В клетках, демонстрирующих периферическое расположение PCNA-позитивных сайтов репликации (что соответствует средней S-фазе), реплицирующиеся хромосомные локусы располагались на некотором расстоянии от ядерной ламины. Отсутствие подобного ярко выраженного открепления искусственного хромосомного локуса, по-видимому, объясняется его сложной репликативной организацией: в его составе присутствует несколько асинхронно реплицирующихся кластеров репликаонов, отделяющихся от ядерной ламины попеременно, тогда как полной диссоциации всего локуса не происходит.

РОЛЬ G-БЕЛКОВ В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ИЗОФОРМ ФОСФОЛИПАЗЫ D α И ФОСФОЛИПАЗЫ D β В ЛИСТЬЯХ ТОМАТОВ ПРИ ПОРАЖЕНИИ. © С. В. Суховеева, Е. М. Кабачевская, Г. В. Ляхнович, И. Д. Волоотовский. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь.

Различия в устойчивости к стрессовым факторам и фитопатогенам, наблюдаемые у разных видов и сортов растений, в значительной мере обусловлены особенностями механизмов рецепции и трансдукции стрессовых сигналов. Особая роль в защитных реакциях отводится фосфолипазе D (PLD): изоформы фосфолипазы D расщепляют мембранные фосфолипиды с образованием высокоактивных сигнальных молекул — фосфатидной кислоты и N-ацилэтанолamina (Campos-Vargas, Saltveit, 2002. *Plant Physiol.* 114 : 73). Однако остается не до конца выясненной роль отдельных сигнальных интермедиатов, участвующих в передаче сигнала о механическом повреждении в растении.

В растительной клетке регуляция различных внутриклеточных процессов при действии внешних и внутренних стимулов осуществляется с помощью универсальных посредников, в число которых входят гетеротримерные G-белки (G α - и G $\beta\gamma$ -субъединицы), обладающие модуляторной активностью в отношении аденилатциклазы, фосфолипазы C и ионных каналов (Craig, Malbon, 2005. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6 : 689). Задачей настоящего исследования стало изучение возможной роли гетеротримерных G-белков в контроле экспрессии *PLD β* и *PLD α* при поранении листьев томата.

Полученные в работе данные указывают на то, что гетеротримерные G-белки, судя по данным экспериментов, проведенных с использованием ГТФ γ S-негидролизующего аналога ГТФ, способного стимулировать ГТФазную активность G-белков, принимают участие в контроле экспрессии генов изоформ *PLD β* и *PLD α* . В первые 4 ч после поранения происходит значительный рост экспрессии гена *PLD β* . Ответ растения на поранение в последующие часы уменьшается, и к 24-му ч после нанесения механического повреждения экспрессия *PLD β* почти не отличается от контрольной величины. Противоположенная закономерность наблюдается при измерении уровня экспрессии гена *PLD α* : повышение уровня экспрессии наблюдается между 4 и 24 ч после поранения. Полученные данные свидетельствуют о возможности разнонаправленной регуляции двух изоформ фосфолипазы D через систему G-белков: на относительно ранних этапах ответа на поранение стимуляции экспрессии гена *PLD β* активатором G-белков сопровождается снижением экспрессии гена *PLD α* . Обнаруженный эффект может указывать на функционирование на разных этапах реакции на стресс той или иной изоформы фосфолипазы D: *PLD β* активируется на более раннем этапе ответа растения на поранение. Эти наблюдения совпадают с имеющимися в литературе сведениями о функциях *PLD β* в растительной клетке, которая заключается в гидролизе минорного мембранного фосфолипида N-ацилфосфатидилэтанол-амина с образованием сигнальной молекулы N-ацилэтанолamina, которая в свою очередь может вызывать освобождение NO (Stefano et al., 1996. *J. Biol. Chem.* 271 : 19 238).

СИГНАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ, ИЗМЕНЕНИЯ АДГЕЗИИ, ЦИТОСКЕЛЕТА И КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА, ИНИЦИИРУЕМЫЕ СУБЛЕТАЛЬНЫМ ФОТОДИНАМИЧЕСКИМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ В КЛЕТКАХ ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА. © А. Б. Узденский,^{1,2} А. Юзенине,² Й. Моан.² ¹ Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, и ² Институт исследований рака, Осло, Норвегия.

Несмотря на большое внимание, уделяемое изучению механизмов клеточной смерти, начальные стадии реакций клеток на внешние воздействия изучены недостаточно. Мы изучали эти проблемы на примере «ранения» клеток глиобластомы человека сублетальным фотодинамическим (ФД) воздействием 5-аминолевулиновой кислоты (ALA), являющейся предшественником эндогенного фотосенсибилизатора протопорфирина IX. Для всесторонней характеристики изменений сигнальных и структурных белков нами использованы протеомные микрочипы Panorama Antibody Cell Signaling Microarray (Sigma-Aldrich, США). Они позволяют изучить изменения экспрессии 224 клеточных белков, участвующих в сигнальной трансдукции, регуляции клеточного цикла, апоптоза, адгезии и цитоскелета в культивируемых клетках глиобластомы человека D54Mg. Клетки глиобластомы инкубировали 2 ч с 1 мМ ALA в темноте, а затем облучали 1 мин синим светом (370—450 нм; 0,6 мВт/см²). Выживаемость клеток, определенная с помощью МТТ-теста, составляла 95 %. После ФД-воздействия клетки инкубировали 0,5, 1, 2 или 5,5 ч в темноте. Затем их лизировали, опытный и контрольный образцы конъюгировали с флуорохромами Cy3 и Cy5 и в смеси этих растворов инкубировали один из микрочипов. Другой микрочип инкубировали с противоположно окрашенными образцами (Cy5 и Cy3 соответственно), что обеспечивало полный самоконтроль эксперимента. Микрочипы сканировали на длинах волн 532 и 635 нм, соответствующих максимумам флуоресценции Cy3 и Cy5 соответственно. Было показано, что из сигнальных белков стабильно повышалась экспрессия протеинкиназы C γ . Повышался также уровень фосфорилирования белка Raf, компонента сигнального пути Ras/Raf/MEK/ERK. Возможно, активация Raf была связана с ФД-индуцированным изменением клеточной адгезии, которое приводило к выраженной активации (фосфорилированию) протеинкиназ FAK и Pyk2. Снижение уровня дистрофина и калпонаина через 30 мин после воздействия ФД и позднее винкулина отражало перестройки адгезионных фокальных контактов и примембранных платформ, связывающих интегрины с актиновым цитоскелетом. Также изменялась экспрессия белков, участвующих в реорганизации микротрубочек: снижалась экспрессия 3'-фосфодиэстеразы 2',3'-циклических нуклеотидов (CNP), усиливались фосфорилирование белка tau и экспрессия белка MAP1B. Уровень MAP2 при этом снижался. Кроме того, снижался уровень общих цитокератинов и особенно цитокератинов 4 и 7. Воздействие ФД ингибировало пролиферацию. В первые 30 мин после него уровни циклина D1, контролирующего переход G₀/G₁, белка cMyc и сверхчужбых белков Chk1/2, контролирующих переход G₂/M, снижались. Через 1 ч повышались уровни фактора транскрипции E2F1, стимулирующего переход G₁/S, и белка CDC-27, управляющего переходом G₂/M. Уровень белка Bcl-X_L повышался, а уровень каспазы 9 снижался, что защищало клетки от апоптоза. Но при этом повышалась экспрессия проапоптозных рецепторов нейротрофинов p75. Одновременно отмечено снижение уровня белка S100B и накопление β -синуклеина. Таким образом, сублетальное воздействие ФД вызывало в клетках глиобластомы изменения уровня белков, участвующих в сигнальных путях, связанных с изменениями адгезии, перестройками цитоскелета, регуляцией клеточного цикла и апоптоза.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект

ты 08-04-01322 и 11-04-01476) и Минобрнауки РФ (16.740.11.0368).

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ КИНАЗ РИБОСОМНОГО БЕЛКА S6K1 И S6K2 КОРРЕЛИРУЕТ С УРОВНЕМ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ТИРЕОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ДВУ- И ТРЕХМЕРНОЙ КУЛЬТУР КЛЕТОК ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.
© А. И. Хоруженко, О. В. Чередник, В. В. Филоненко. Институт молекулярной биологии и генетики НАНУ, Киев, Украина.

Целью данной работы было исследование субклеточной локализации S6K1 и S6K2 в тиреоцитах при разных условиях культивирования и определение возможной связи процессов пролиферации, миграции и изменения функциональной активности клеток с релокализацией указанных форм S6K. Для этого получили дву- и трехмерные культуры без сохранения (монослойные и сфероидные культуры) и с сохранением фолликулярной организации (агрегаты фолликулов) тиреоцитов. Определение содержания тиреоглобулина показало резкое снижение функциональной активности тиреоцитов монослойных и сфероидных культур по сравнению с агрегатами фолликулов. Продемонстрирована динамика уменьшения содержания тиреоглобулина в тиреоцитах крысы в ходе распластывания фолликулов в монослой. На такой модели экспериментально вызванного дедифференцирования тиреоцитов исследовали внутриклеточную локализацию S6K1/2, важного звена сигнального пути PI3K, который опосредует регуляторное влияние ТТГ на клетки щитовидной железы. Была обнаружена внутриклеточная релокализация S6K1/2, а именно появление этих киназ наряду с цитоплазмой и в ядрах культивируемых тиреоцитов на 6-е и 10-е сут в отличие от нормальной ткани щитовидной железы, где S6K1/2 локализованы преимущественно в цитоплазме. Более того, положительная реакция сначала возникала в ядрах клеток, расположенных по периферии распластывающегося фолликула, и лишь со временем — в участках центральной зоны. Культивирование фолликулов щитовидной железы в двумерных условиях сопровождается активацией процессов миграции, пролиферации и потерей исходной гистологической структуры. Поэтому дальнейшие исследования были направлены на определение того, какой из этих процессов обуславливает внутриклеточную релокализацию S6K1 и S6K2. Нами не обнаружено корреляции между появлением S6K1/2-положительных ядер тиреоцитов и локализацией пролиферирующих клеток. С другой стороны, отмечено повышение содержания S6K1/2 в Ki-67-положительных клетках. Внутриклеточное распределение S6K1 и S6K2 определяли в клетках, мигрировавших через пористые мембраны трансвеллов. Не обнаружено связи между процессом миграции тиреоцитов и изменением субклеточной локализации S6K1/2. Однако показано наличие корреляции между содержанием тиреоглобулина в тиреоцитах агрегатов фолликулов в условиях трехмерной культуры и цитоплазматической локализацией S6K1 ($P < 0.01$, $n = 1459$) и S6K2 ($P < 0.01$, $n = 771$). Таким образом, показано наличие корреляции между субклеточной локализацией S6K1/2 и уровнем функциональной активности тиреоцитов, культивируемых в условиях дву- и трехмерной культуры.

РОЛЬ ОГРАНИЧЕННОГО ПРОТЕОЛИЗА АКТИНА В МЕХАНИЗМЕ ИНВАЗИИ БАКТЕРИЙ, СИНТЕЗИРУЮЩИХ ПРОТЕАЛИЗИН. © О. А. Цаплина,¹ Т. Н. Ефремова,¹ И. В. Демидюк,² С. Ю. Хайтлина.¹ ¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и ² Институт молекулярной генетики РАН, Москва, olga566@mail.ru.

Ранее мы обнаружили, что условно-патогенные бактерии рода *Serratia*, синтезирующие актин-специфические металлопротеазы ECP32/гримелизин и протеализин, способны проникать в эукариотические клетки. Трансформация неинвазивных *E. coli* плазмидной ДНК, несущей ген гримелизина или протеализина, приводит к появлению в бактериях инвазивной активности, что свидетельствует об активной роли фермента в инвазии (Bozhokina et al., 2011). При инвазии рекомбинантных бактерий и бактерий дикого штамма *S. proteamaculans* поликлональные антитела к протеализину выявляют протеазу как во внеклеточной среде, так и внутри эукариотических клеток. Вне клетки бактериальные протеазы могут становиться вирулентными факторами, активируя или ингибируя матриксные металлопротеазы (ММП). По данным зимографии, протеализин расщепляет предшественник ММП-2 с образованием белка с мол. массой 66 кДа, характерной для активной формы ММП-2, что указывает на возможность активации ММП-2 протеализином. Однако добавление протеализина в клеточную среду не приводит к проникновению неинвазивных бактерий *E. coli* внутрь эукариотических клеток. Таким образом, протеализин, по-видимому, участвует в инвазии бактерий, оказавшись внутри эукариотической клетки.

В процесс инвазии всегда вовлечены перестройки актинового цитоскелета, а актин является одним из немногих клеточных субстратов ECP32/гримелизина (Matveyev et al., 1996). Так же как ECP32/гримелизин, протеализин расщепляет в глобулярном (G) актине связь Gly42—Val43, а при увеличении концентрации протеазы до весового соотношения фермент : G-актин 1 : 50 появляются дополнительные сайты протеолиза Gly63—Ile64 и Thr66—Ile67 в нуклеотидной щели молекулы актина. G-актин, расщепленный в сайте Gly42—Val43, теряет способность к полимеризации, которая частично восстанавливается после замены прочно связанных ионов Ca на ионы Mg. Такой F-актин обладает высокой АТФазной активностью, что отражает значительное усиление динамики полимера по сравнению с нерасщепленным актином, и стабилизируется аналогом неорганического фосфата фторидом алюминия. Однако кортикальный цитоскелет состоит в основном из менее доступного для протеолиза фибриллярного актина, свойства которого после протеолитического расщепления ранее не проверялись. Оказалось, что за время, примерно соответствующее времени проникновения бактерий в клетки, протеализин расщепляет от 20 до 40 % F-актина, что уменьшает степень полимеризации F-актина. АТФазная активность F-актина после расщепления увеличивается, и ее величина хорошо согласуется с АТФазной активностью F-актина, заполнившегося из расщепленных субъединиц. Таким образом, расщепление G- и F-актина протеализином обратимо усиливает динамику полимеров, что может обеспечивать перестройки актинового цитоскелета в эукариотической клетке, необходимые для интернализации бактерий. Поэтому мы предполагаем, что актин является мишенью протеализина в эукариотической клетке и протеализ актина вовлечен в механизм инвазии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 11-04-00393) и программы РАН «Молекулярная и клеточная биология».

ИНГИБИРОВАНИЕ КИНАЗЫ mTOR ТОРМОЗИТ НЕКОТОРЫЕ СТАДИИ ПРОГРЕССИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НА МОДЕЛИ IN VITRO. © О. В. Чередник, В. Р. Кухарчук, В. В. Филоненко, А. И. Хоруженко. Институт молекулярной биологии и генетики НАНУ, Киев, Украина.

Киназа mTOR является одним из ключевых звеньев передачи сигнала от множества ростовых факторов и гормонов внутрь клетки. mTOR участвует в регуляции белкового синтеза, клеточного роста, пролиферации и других процессах. Существуют два функциональных комплекса TORC1 и TORC2, которые принимают участие в регуляции многочисленных внутриклеточных процессов. Ранее была показана сверхактивация mTOR в клетках многих злокачественных неоплазий. В настоящее время ингибиторы mTOR рассматриваются как противоопухолевые препараты. Однако остается неясным, какие именно этапы канцерогенеза критически зависят от активации (дезактивации) mTOR. Прояснение этого вопроса позволит определить дополнительные мишени противораковой терапии, регулируемые mTOR. Это в свою очередь обеспечит дальнейшее развитие комбинированной противоопухолевой терапии.

Для определения субклеточной локализации mTOR использовали клетки линии MCF-7, происходящей из рака молочной железы. Влияние рапамицина (специфического ингибитора mTOR) в концентрациях 1 и 10 нМ на пролиферацию и миграцию клеток MCF-7 изучали при помощи МТТ-теста и метода «раневой поверхности» соответственно. Кроме того, определяли степень адгезии и расплывания клеток, продукцию матриксдеградирующих ферментов. При помощи конфокальной микроскопии исследовали структуру актинового цитоскелета с использованием TRITC-меченного фаллоидина.

Иммунофлуоресцентный анализ выявил преимущественно цитоплазматическую локализацию mTOR в клетках MCF-7. Однако наблюдались положительно окрашенные ядрышки клеток. Колокализация mTOR с белком S6, который в том числе содержится и в ядрышках, подтвердила наше предположение. Таким образом, впервые выявлена ядрышковая локализация киназы mTOR.

Процесс канцерогенеза гипотетически был разбит на несколько интегральных этапов, которые были промоделированы *in vitro* с использованием указанных клеток. Поведение клеток в условиях ингибирования активности mTOR рапамицином (1 и 10 нМ) исследовали в соответствующих модельных условиях. Было зафиксировано снижение уровня клеточной адгезии к ростовой поверхности до 40 % в разных временных точках. Кроме того, было выявлено незначительное, но статистически достоверное снижение уровня расплывания клеток на культуральной поверхности.

Угнетение mTOR приводило к значительному (до 80 %) снижению локомоторных свойств клеток при исследовании их миграции на модели «раневой поверхности». Кроме того, был обнаружен эффект рапамицина на структуру актинового цитоскелета. Так, была показана существенная разница в организации актинового скелета

перинуклеарной зоны клеток, находившихся под воздействием рапамицина. В этих же условиях снижение активности матриксдеградирующего энзима MMP-9 было показано путем зимографии.

Таким образом, впервые показана локализация mTOR в ядрышках клеток карциномы молочной железы. Наиболее выраженное влияние ингибирования mTOR наблюдалось на миграционные свойства клеток и на ремоделирование актинового цитоскелета. Наша последующая работа будет направлена на изучение роли mTOR α и нового сплайсингового варианта mTOR β в опухолевой прогрессии клеток молочной железы в условиях дву- и трехмерной культур.

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ ЯДЕРНОГО РЕЦЕПТОРА HNF4 α НА СВОЙСТВА КЛЕТОК ПРОТОКОВОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА. © М. С. Чесноков, Д. А. Шавочкина, И. Ф. Кустова, А. Г. Кузнецова, Н. Л. Лазаревич. Институт канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва.

Транскрипционный фактор HNF4 α — ядерный рецептор, экспрессирующийся в клетках печени, поджелудочной железы, кишечника и ряда других органов. Он контролирует экспрессию множества генов, вовлеченных в регуляцию процессов клеточной дифференцировки, пролиферации, миграции, поддержания эпителиальной морфологии и метаболизма. В свою очередь транскрипция HNF4 α регулируется внеклеточными сигналами — факторами роста и компонентами микроокружения. Таким образом, HNF4 α является связующим звеном между сигналами, поступающими в клетку извне, и сигнальными каскадами, вызывающими ответное изменение характеристик клетки. Нарушения экспрессии HNF4 α ассоциированы с прогрессией гепатокарцином, а ее восстановление приводит к частичной реверсии опухолевого фенотипа. HNF4 α также является опухолевым супрессором в клетках почек и важен для контроля дифференцировки и пролиферации клеток кишечника.

Описано 9 изоформ фактора HNF4 α , транскрибирующихся с двух независимых промоторов P1 (HNF4 α 1-6) и P2 (HNF4 α 7-9) и различающихся трансактивационными свойствами. Для нормальной ткани поджелудочной железы человека характерна экспрессия группы HNF4 α P2. Высокодифференцированные клеточные линии протоковой аденокарциномы поджелудочной железы характеризуются активацией нехарактерной группы изоформ HNF4 α P1, в то время как в низкодифференцированных опухолевых клетках подавляется экспрессия всех изоформ HNF4 α . Для выяснения роли нарушений нормальной экспрессии HNF4 α в прогрессии этого типа опухолей из низкодифференцированных линий Panc1 и MiaPaCa2 были получены культуры, экзогенно экспрессирующие изоформы HNF4 α 1 и HNF4 α 7.

Экзогенная экспрессия изоформ фактора HNF4 α привела к восстановлению экспрессии ключевых тканеспецифических регуляторных факторов поджелудочной железы PDX1 и PTF1 α и повышению общего уровня дифференцировки клеток. Клетки, экспрессирующие изоформы HNF4 α , характеризовались ослаблением колониеобразующего потенциала по сравнению с клетками контрольных линий. В линии MiaPaCa 2 экзогенная экспрессия HNF4 α сопровождалась снижением скорости пролифера-

ции клеток и интенсивности синтеза ДНК. В культурах, экспрессирующих изоформы HNF4 α , наблюдалось повышение способности к направленной миграции по сравнению с контрольными линиями.

Полногеномное исследование уровней экспрессии генов показало, что восстановление экспрессии HNF4 α в клетках линии MiaPaCa2 сопровождается изменениями уровней экспрессии ряда генов, участвующих во многих внутриклеточных сигнальных путях. Наиболее значительны изменения экспрессии генов, регулирующих процессы фокальной адгезии (*ITGA3*, *CAV1*, *CAV2* и *LAMB1*) и пролиферации (*ILK* и *CDK4*).

Полученные данные указывают на то, что экзогенная экспрессия ядерного рецептора HNF4 α в дедифференцированных линиях протоковой аденокарциномы поджелудочной железы человека индуцирует активацию сигнальных каскадов, определяющих повышение уровня дифференцировки клеток и частичную реверсию их злокачественного фенотипа.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-01504) и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (№ 02.740.11.0085).

МЕХАНИЗМЫ ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМНОГО ПЕРЕХОДА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК РАКА ШЕЙКИ МАТКИ. © Г. С. Шагиева, Л. В. Домнина, В. Б. Дугина. Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

При опухолевой трансформации большое значение имеют процессы изменения цитоскелета и увеличения подвижности клеток, которые лежат в основе способности опухолевых клеток к инвазии и метастазированию. При инвазии и метастазировании происходит эпителиально-мезенхимный переход (ЭМП), который приводит к морфологическому и биохимическому преобразованию эпителиальных клеток в фибробластоподобные.

В нашей работе был проведен иммуноморфологический и биохимический анализ межклеточных адгезионных структур клеток рака шейки матки человека линий SiHa, Caski и C33A, реорганизации этих структур при ЭМП, а также предотвращения ЭМП под действием митохондриально направленного антиоксиданта SkQ1 и его аналогов. Было показано, что инкубация клеток культур SiHa, Caski и C33A с митохондриально направленными антиоксидантами приводит к восстановлению эпителиальной организации пучков бета-актиновых микрофиламентов и адгезионных межклеточных контактов.

Инкубация клеток SiHa и Caski с митохондриально направленными антиоксидантами приводила к уменьшению ядерной локализации и общего количества белка Snail, а также снижению уровня фосфорилирования MAP-киназы Erk1/2. Известно, что транскрипционный фактор Snail негативно регулирует экспрессию E-кадгерина, важного участника процесса ЭМП. Инкубация клеток культуры SiHa с митохондриально направленными антиоксидантами SkQ1 и его аналогами приводила к увеличению общего содержания E-кадгерина и альфа-катенина, происходило рекрутирование E-кадгерина в область межклеточных контактов. Более того, SkQR1 и его аналоги предотвращали процесс ЭМП, индуцированный добав-

лением эпидермального ростового фактора EGF, в культурах клеток SiHa и Caski.

Выявленные изменения морфологии, MAP-киназного каскада, организации актинового цитоскелета и межклеточных контактов, а также увеличение экспрессии E-кадгерина и альфа-катенина продемонстрировали способность митохондриально направленных антиоксидантов индуцировать процессы эпителиальной дифференцировки неопластически трансформированных клеток и предотвращать процесс эпителиально-мезенхимного перехода в культурах клеток рака шейки матки.

УЧАСТИЕ НЕМЫШЕЧНОГО МИОЗИНА II В ОБРАЗОВАНИИ ЛАМЕЛЛИПОДИИ И ИНИЦИАЦИИ ФОКАЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ. © М. Шутова,^{1,2} А. Александрова,¹ Ю. Васильев,¹ Т. Свиткина.² ¹ Институт канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва, и ² Университет Пенсильвании, Филадельфия, США.

В процессе клеточной миграции миозин II-зависимое сокращение обеспечивает ретракцию задней части клетки и созревание фокальных контактов, в то время как протрузия ведущего края и инициация контактов с субстратом считаются независимыми от немышечного миозина II. В настоящей работе эта концепция подверглась повторной проверке с помощью обработки линии фибробластов REF52 высокими концентрациями блеббистатина, ингибитора миозина II, для максимального подавления его моторной активности. Был проведен детальный анализ организации цитоскелета и способности клеток к протрузии с использованием световой и электронной микроскопии платиновых реплик. Было показано, что действие 75 мкМ блеббистатина разрушает зрелые стресс-фибриллы и фокальные контакты, но не ингибирует образование ламеллиподий и фокальных комплексов, что согласуется с ранее известными данными. Однако действие 100 мкМ блеббистатина, кроме того, вызывало подавление образования ламеллиподий и их трансформацию в раффлы, ретракцию клеточного края и зачастую открепление клеток от субстрата, а также перераспределение фосфорилированного миозина на край клетки. При действии ингибитора в обеих концентрациях многократно уменьшалась фракция связанного с цитоскелетом миозина II и количество биполярных миозиновых филаментов. После отмывки ингибитора восстановление начиналось с быстрого (в течение 1 мин) ухода фосфорилированного миозина от клеточного края и интенсивного образования ламеллиподий и многочисленных фокальных комплексов в их основании. Стресс-фибриллы появлялись к 5-й мин отмывки; как правило, тонкие актин-миозиновые арки формировались между фокальными комплексами и часто возникали из филоподий. На дальнейших этапах восстановления (5—15 мин) происходило параллельное созревание стресс-фибрилл и контактных структур. Разрозненные биполярные филаменты миозина все еще редко обнаруживались через 1 мин отмывки, но их количество возрастало параллельно с образованием стресс-фибрилл; постепенно филаменты миозина начинали формировать цепочки и плотные стопки. Согласно нашим данным, моторная активность миозина II необходима для успешного образования фокальных комплексов, которые обеспечивают начальное прикрепление, необходимое для эффективной протрузии ламеллиподии.

Предполагается, что миозин II активируется фосфорилированием на ведущем крае и инициирует образование фокальных комплексов из насцентных адгезий, вероятно, еще до полного образования биполярных филаментов. Фокальные комплексы в дальнейшем поддерживают созревание актиновых пучков, преобразуясь в фокальные контакты.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00452), а также фонда исследований Университета Пенсильвании.

ВЫЯВЛЕНИЕ ЭФФЕКТОВ И МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ ГИДРОСУЛЬФИДА НАТРИЯ В МИОКАРДЕ ЛЯГУШКИ. © А. В. Яковлев, Д. Р. Ахметшина, Н. Н. Хаердинов, Г. Ф. Ситдикова. Казанский (Приволжский) федеральный университет.

Сероводород (H_2S) относится к новому классу посредников, участвующих в регуляции сердечно-сосудистой системы. В сердце H_2S образуется из L-цистеина ферментами цистатионин- γ -лиазой (CSE) и 3-меркаптопируватсульфотрансферазой (3-MST). Влияние H_2S на сосудистый тонус показано у всех классов позвоночных животных, включая рыб, амфибий, млекопитающих, и включает в себя как вазоконстрикцию, так и вазодилатацию. В кардиомиоцитах крысы H_2S проявлял отрицательный инотропный эффект. Целью работы было исследование влияния и его механизмов донора H_2S гидросульфида натрия (NaHS) на сократимость миокарда лягушки *Rana ridibunda*.

Эксперименты проводили на изолированных полосках миокарда желудочка лягушки. Для оценки влияния NaHS на сократимость использовали тензодатчики с чувствительностью 0—50 г на базе системы PowerLab (ADInstruments) согласно общепринятым подходам. Относительные изменения внутриклеточной концентрации кальция Ca^{2+} в изолированных полосках миокарда определяли при помощи мембранно-проникающего Ca-чувствительного флуоресцентного красителя Fluo-4-AM в концентрации 1 мкМ (Molecular Probes, США).

Донор H_2S (NaHS) дозозависимым образом приводил к угнетению силы сокращения миокарда желудочка. Так, NaHS в концентрации 100 мкМ вызывал падение амплитуды на 25 % относительно контроля.

Субстрат синтеза H_2S L-цистеин (1 мМ) также вызывал двукратное снижение амплитуды сокращения полоски миокарда через 20 мин после его аппликации. Ингибирование активности CSE блокаторами β -цианоаланином и пропаргилглицином (500 мкМ) вызывало повышение амплитуды сокращения миокарда на 12 и 17 % соответственно.

Известно, что увеличение уровня цАМФ при активации β -адренорецепторов в миокарде приводит к увеличению силы сокращения миокарда за счет фосфорилирования потенциалзависимых Ca-каналов. Поэтому исследовали роль системы аденилатциклазы (АЦ) в эффектах NaHS. Блокатор АЦ MDL-12,330A (3 мкМ) приводил к понижению силы сокращения миокарда на 16 %, а донор H_2S на его фоне снижал амплитуду сокращения еще на 16 %, что меньше эффекта газа в контроле. Неспецифический блокатор фосфодиэстераз 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, 200 мкМ) приводил к увеличению силы сокращения. На фоне IBMX NaHS снижал силу сокращения полоски миокарда на 18 %, и этот эффект был достоверно меньше, чем эффект NaHS в контроле. Полученные данные указывают на участие системы цАМФ в эффектах NaHS.

Увеличение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} играет ключевую роль в процессах возбуждения и сокращения в кардиомиоцитах. Во время стимуляции с частотой 0.5 Гц в миокарде предсердия лягушки, предварительно инкубированного в растворе с Fluo-4-AM, наблюдали быстрые кратковременные повышения интенсивности флуоресценции, отражающие изменения концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле (Ca-сигналы). Аппликация донора H_2S (NaHS, 100 мкМ) обратимо вызывала снижение интенсивности свечения на 86 % относительно контроля.

Предположили, что в миокарде лягушки экзогенный и эндогенный H_2S вызывает отрицательный инотропный эффект, в основе которого лежит снижение уровня ионов Ca^{2+} в кардиомиоцитах. Снижение концентрации ионов Ca^{2+} может быть связано с уменьшением Ca-тока через потенциалзависимые Ca-каналы вследствие понижения уровня цАМФ и активности протеинкиназы А при действии газа.

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