

## ГИПЕРТЕРМИЯ ИНДУЦИРУЕТ ОДНОВРЕМЕННО ПЕРЕСТРОЙКИ ВСЕХ ИЗВЕСТНЫХ ЦИТОСКЕЛЕТНЫХ ФИЛАМЕНТОВ В НОРМАЛЬНЫХ ИНТЕРФАЗНЫХ ФИБРОБЛАСТАХ

© Л. П. Гаврилова,<sup>1,\*</sup> И. И. Корначева,<sup>1</sup> С. Г. Семушина,<sup>2</sup> В. А. Яшин<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Институт белка РАН, <sup>2</sup> Филиал Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН и <sup>3</sup> Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Московская обл.;  
\* электронный адрес: lpg@vega.protres.ru

Гипертермия (тепловой шок, HS) индуцирует изменения в морфологии ядрышек, цитоплазматических органелл и цитоскелета. Ответы на гипертермию, как правило, сходны у разных типов клеток эукариот. Однако в литературе нет информации о сходстве ответа цитоскелета на тепловой шок (CHSR) в разных типах клеток. Это привело к заключению о том, что CHSR эукариот зависит от типа клеток. Мы изучали CHSR только в одном типе клеток — в нормальных эмбриональных фибробластах мыши (NEMF) и крысы (NERF) и постнатальных крысиных фибробластах (NPRF) методом флуоресцентной микроскопии. Инкубация клеток при 43 °С приводила к реорганизации цитоскелета. Ответ цитоскелета на HS в NEMF, NERF и NPRF был сходным. При гипертермии актиновые филаменты (AF) разбирались, изменялась морфология микротрубочек (MT), промежуточные филаменты (IF) коллапсировали вокруг ядра. Перестройки разных типов цитоскелетных филаментов протекали одновременно и были видны через 2—4 мин инкубации в условиях гипертермии. После 30—120 мин при 43 °С клетки были способны вновь построить актиновый цитоскелет, если температура среды опускалась до нормы (37 °С). Обсуждаются данные о возможном сопряжении процесса перестройки цитоскелета с реорганизацией белоксинтезирующей системы, что приводит к инициации и (или) стимуляции синтеза белков теплового шока.

Ключевые слова: цитоскелет, тепловой шок, эмбриональные фибробласты мыши и крысы, постнатальные фибробласты крысы, флуоресценция.

Принятые сокращения: AF — актинсодержащие филаменты, АТА — альбумин бычий сывороточный, Тритон X-100 и азид натрия в PBS, CHSR — ответ цитоскелета на тепловой шок, HS — тепловой шок, hsp — белки теплового шока, IF — промежуточные филаменты, MT — микротрубочки, NEMF — нормальные эмбриональные мышечные фибробласты, NERF — нормальные эмбриональные крысиные фибробласты, NPRF — нормальные постнатальные крысиные фибробласты, PBS — фосфатно-солевой буферный раствор.

Тепловой шок (HS) в живых эукариотических клетках заметен, когда температура окружающей среды на 3—8 °С выше нормальной. Гипертермия индуцирует изменения в клеточной физиологии: меняется регуляция генной экспрессии, усиливается синтез белков теплового шока (hsp); HS влияет на морфологию ядрышек, цитоплазматических органелл, а также на цитоскелет (Welch, Suhan, 1985). Симптомы ответа на тепловой шок сходны для разных типов клеток эукариот. Однако, согласно литературе, есть исключение из правил. Это ответ цитоскелета на тепловой шок (CHSR).

CHSR эукариотических клеток изучали, используя как нормальные, так и трансформированные клетки. Сходства в CHSR не было обнаружено. Опубликованные результаты позволили прийти к заключению о том, что «the cytoskeleton heat shock response is cell type dependent» (Coss, Linnemans, 1996). Это может означать, что перестройка цитоскелета в условиях теплового стресса не есть обязательный жизненно необходимый универсаль-

ный механизм, включенный в реализацию защиты клетки от теплового шока. С другой стороны, отсутствие видимого изменения в морфологии цитоскелета в условиях HS могло бы возникнуть из-за каких-либо внутриклеточных дефектов, которые запрещают цитоскелетную перестройку в некоторых типах эукариотических клеток. Анализ опубликованных данных по CHSR выявляет заметное несходство экспериментальных условий у разных авторов, что исключает достоверное сравнение результатов (см. таблицу). Поэтому вопрос о сходстве или несходстве CHSR среди эукариотических клеток остается открытым.

Мы изучали морфологию цитоскелета в условиях HS (43 °С) только в одном типе клеток — в нормальных интерфазных эмбриональных и постнатальных фибробластах крысы. Было обнаружено, что HS индуцирует реорганизацию цитоскелетных филаментов всех типов: актиновых филаментов (AF), микротрубочек (MT) и промежуточных филаментов (IF). CHSR в NEMF, NERE

## Наличие ответа цитоскелета на тепловой шок (HS) в эукариотических клетках

Тип клеток	HS, °C	Время подъема температуры, мин	Экспериментальные точки, мин	AF	MT	IF	Литературный источник
Эмбриональные							
Фибробласты цыпленка	45		5, 15, 30, 60, 120, 180	–	–	+	Collier, Schlesinger, 1986
	45		5, 15, 30, 60	+	НД	НД	Miron et al., 1991
Фибробласты крысы (19-суточные зародыши)	42	5—10 при 42—43 °C	180	–	–	+	Welch, Suhan, 1985
Фибробласты крысы (19—21-суточные зародыши)	43	11	15, 30, 60, 120, 180	+	+	+	Рис. 2
Фибробласты мыши (19—21-суточные зародыши)	43	11	0, 2, 5, 30, 60, 120, 180	+	+	+	Рис. 3
Постнатальные							
Фибробласты человека	45		30	+	–	–	Laszlo, 1992
	43		3, 5, 10, 15, 30, 60	+	+	+	Сперанская, Гаврилова, 1996
Фибробласты кожи 2—3-суточных крыс	43	11	0, 2, 4, 6, 10, 15, 30, 60, 120	+	+	+	Рис. 1
Эпителиальные, молочная железа мыши	41		30	–	–	–	Shyy et al., 1989
	43		30	+	–	+	То же
	45		15	+	–	+	» »
T-лимфоциты мыши	42		30	НД	+	НД	Knox et al., 1991
Клеточные культуры							
СНО	45		1, 5, 15	+	НД	НД	Glass et al., 1985
Кератиноциты человека	45		10	+	НД	НД	Kitano, Okada, 1990
NRK-49F(ATCC CRL1570)	45		5, 10, 15, 30, 60	+	–	–	Ohtsuka et al., 1993
Фибробласты мыши С3Н 10Т1/2	45		30	+	+	–	Coss, Linnemans, 1996
Фибробласты мыши С3Н-2К	42, 43	4	30, 45—90	+	–	–	Iida et al., 1986
Клетки 3Y1-B	42, 43	4	45	+	–	–	То же
HeLa (S-3)	42, 43	4	45	+	–	–	» »
NIH/3T3 Swiss <sup>a</sup>	43	11	0, 5, 10, 30, 60	+	+	+	
3Т3	45		30	+	+	+	Coss, Linnemans, 1996
Гепатома крысы (H35) <sup>b</sup>	43		30	+	–	–	Van Bergen en Henegouwen et al., 1985
Нейробластома мыши N2A <sup>b</sup>	43		30	–	+	+	То же
	43		30	+	+	+	Van Bergen en Henegouwen, Linnemans, 1987
Опухоль мозга крысы (RBT) 9L	45	3	30, 60	НД	НД	+	Cheng, Lai, 1994

Примечание. + — реорганизация, – — без видимых морфологических изменений, НД — не делали. <sup>a</sup> Гаврилова Л. П. Отчет РФФИ № 96-04-50643, 1996; <sup>b</sup> аналогичные изменения цитоскелета наблюдались при температуре от 40 до 45 °C.

и NPRF был одинаковым. Анализ динамики CHSR показал, что перестройки трех типов филаментов цитоскелета протекают одновременно и видны уже через 2—4 мин после начала HS. Одинаковые ответы цитоскелета на HS мы наблюдали также в фибробластах человека, мыши, а также в клетках NIH/3T3 Swiss (см. таблицу). Таким образом, согласно нашим вышеупомянутым данным, перестройки разных цитоскелетных структур представляют собой одну из четко выраженных характеристик реакции на HS в нормальных фибробластах. Поэтому мы считаем, что заключение о сходстве или несходстве CHSR должно начинаться прежде всего с изучения CHSR в различных

типах нормальных клеток. Хромосомные дефекты, мутации и другие поломки могут исказить естественный механизм ответа клетки на тепловой шок.

Возникает вопрос: для какой цели создан природный механизм глобальной перестройки цитоскелета в ответ на гипертермию? С какими другими процессами могла бы быть сопряжена глобальная перестройка цитоскелета в клетках, попавших в условия HS?

Известно, что при HS клетки увеличивают и (или) начинают синтез так называемых белков теплового шока. Инициация и (или) стимуляция синтеза hsp сопровождается глобальной реорганизацией белоксинтезирующей

системы. Например, в клетках *Drosophila melanogaster* за 10 мин инкубации в условиях HS 90 % предшествовавших полисом исчезают и нормальный клеточный синтез белка заметно уменьшается. Затем через 30 мин HS организуются полисомы, запрограммированные вновь синтезированными мРНК для белков теплового шока (Lindquist, 1980, 1987). Таким образом, реорганизация цитоскелета (рис. 1—3) и репрограммирование аппарата трансляции для синтеза hsp происходят практически одновременно. Сопряжены ли эти процессы друг с другом? Некоторые данные указывают на возможную связь цитоскелета с белоксинтезирующей системой. Так, согласно данным электронной и иммунофлуоресцентной микроскопии, некоторые мРНК (Singer et al., 1989; Hesketh, Pryme, 1991), рибосомы (Toh et al., 1980; Gavrilova et al., 1987; Hesketh et al., 1991) и фактор элонгации 2 (eEF-2) (Gavrilova et al., 1987; Shestakova et al., 1991, 1993a, 1993b) наблюдали вблизи или вдоль некоторых актинсодержащих филаментов. Разборка актинового цитоскелета цитохалазином D приводила к исчезновению как длинных актиновых филаментов, так и «нитей» eEF-2 (Shestakova et al., 1993b). Это означало, что организация eEF-2 в видимые «нити», расположенные вдоль AF, зависит от целостности актинсодержащего цитоскелета. Оказалось, что переход фибробластов от пролиферации в фазу G<sub>0</sub> клеточного цикла сопровождается разборкой большей части внутриклеточных AF и распределением eEF-2 и рибосом главным образом вдоль промежуточных филаментов и (или) микротрубочек (Shestakova et al., 1993a). Таким образом, возможно, что разные типы цитоскелета в клетках эукариот могут быть вовлечены в организацию белоксинтезирующей системы.

Здесь мы предлагаем рассмотреть причины того, почему необходимы дальнейшие исследования, чтобы прийти к окончательному заключению по вопросу о том, зависит ли ответ цитоскелета на тепловой шок от типа эукариотической клетки или CHSR есть один из обязательных этапов универсального механизма защиты клеток эукариот от теплового шока.

## Материал и методика

**Содержание животных.** Животные — самки мышей стока CD-1 и крыс стока WKY или CD SPF-категории и их пометы — до использования в эксперименте содержались в стандартных условиях барьерной зоны в соответствии с «Программой по уходу и использованию животных» в лаборатории биологических испытаний ФИБХ РАН, имеющей аккредитацию AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care). Все манипуляции с животными проводили в соответствии с «Протоколом-заявкой на животных», рассмотренным и одобренным «Институтской комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных» ФИБХ РАН 16.02.2009, регистрационный номер 222/09.

**Клеточные культуры.** В работе использовали только один тип клеток — нормальные интерфейзные фибробласты. NEMF и NERF получали из 19—21-суточных эмбрионов мышей (сток CD-1) или крыс (сток WKY). NPRF получали из 2—3-суточных крыс (сток CD). Эвтаназию проводили с помощью галотана (Россия). При проведении всех процедур использовали предварительно нагретые до 37 °C растворы. Фибробласты выделяли по-

сле инкубации измельченной ткани с раствором коллагеназы (1.5—2.0 мг/мл) (Worthington, США, 131 U/mg) или трипсина (0.1 %) в PBS от 30 до 60 мин при 37 °C. Клетки культивировали во флаконах площадью 25 см<sup>2</sup> (Costar, США, или Greiner, Германия) в среде Игла MEM с 10 % фетальной бычьей сыворотки (Gibco, США) и 80 мкг/мл гентамицина (Россия), pH 7.4, при 37 °C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (New Brunswick Scientific Co., Inc., США) при 5 % CO<sub>2</sub> и 80—85 % влажности.

**Гипертермия.** В экспериментах по HS использовали нормальные первичные эмбриональные и постнатальные фибробласты 3—5 пассажей. Для их приготовления клетки 2—4 пассажей растили до монослоя, затем культуральную среду удаляли, клетки промывали 5 мл теплового раствора (37 °C) трипсин (0.25 %) — версен 1 : 3 (по объему) в PBS. После этого добавляли свежую порцию того же теплового раствора (2 мл) и флакон помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор при 37 °C на 3—5 мин. После диссоциации монослоя на отдельные клетки трипсинизацию останавливали добавлением 20—25 мл теплой (37 °C) культуральной среды. Эксперименты по HS проводили в стерильных стаканах диаметром 2.5 см. В каждый стакан помещали по два стерильных покровных стекла размером 5×5 мм и заливали их 2 мл полученной клеточной суспензии. Перед проведением опыта по HS клетки на стеклах в стаканах культивировали 24—48 ч при 37 °C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. В экспериментах по HS использовали только те стекла, где фибробласты не образовывали монослоя. HS проводили в водном ультра-термостате U10 (Medingen, Германия) с двумя контактными термометрами на 37 и 43 °C. Нагревание от 37 до 43 °C занимало 11 мин. Во время опыта температура воды в термостате составляла 43.0 ± 0.1 °C. Два стекла с клетками из одного стакана использовали для анализа зависимости состояния цитоскелета от времени инкубации при 43 °C. После окончания тепловой обработки клетки на стеклах промывали PBS и фиксировали 4%-ным параформальдегидом (ICN Biomedicals, Inc., США) на PBS в течение 20 мин при комнатной температуре, затем промывали PBS.

**Антитела и фаллоидин.** Для обнаружения MT в качестве первых антител использовали антитела к альфа-тубулину (клон DM-1A) (ICN Biomedicals, Inc., США) в разведении 1 : 100. В качестве вторых антител использовали козы антимышинные антитела, конъюгированные с TRITC (Sigma, США), в разведении 1 : 300 или овечьи антимышинные антитела, конъюгированные с FITC (Sigma, США), в разведении 1 : 250 или 1 : 500. Для обнаружения виментина были использованы мышинные антивиментиновые антитела (клон V9), конъюгированные с Cy3 (Sigma, США), в разведении 1 : 1500. Для обнаружения полимеризованного актина использовали фаллоидин, конъюгированный с TRITC или FITC (Sigma, США), в разведении 1 : 10 000 или 1 : 1000 соответственно.

**Имунофлуоресцентное окрашивание фибробластов.** Чтобы сделать мембраны проницаемыми для антител и фаллоидина, фиксированные NERF обрабатывали 1%-ным Тритоном X-100 (ICN Biomedicals, Inc., США) на PBS в течение 10 мин при комнатной температуре и промывали PBS. В этом случае окрашивание вели в PBS (см. рис. 2). В опытах с NPRF и NEMF (см. рис. 1 и 3) фиксированные клетки до окрашивания обрабатывали раствором АТА, содержащим 1 % альбумина бычьего сывороточного (Диаэм, Россия), 0.05 % Тритоном X-100 и 0.1 % азида натрия (Россия) в PBS, в течение 5 мин при комнатной температуре; затем клетки промывали

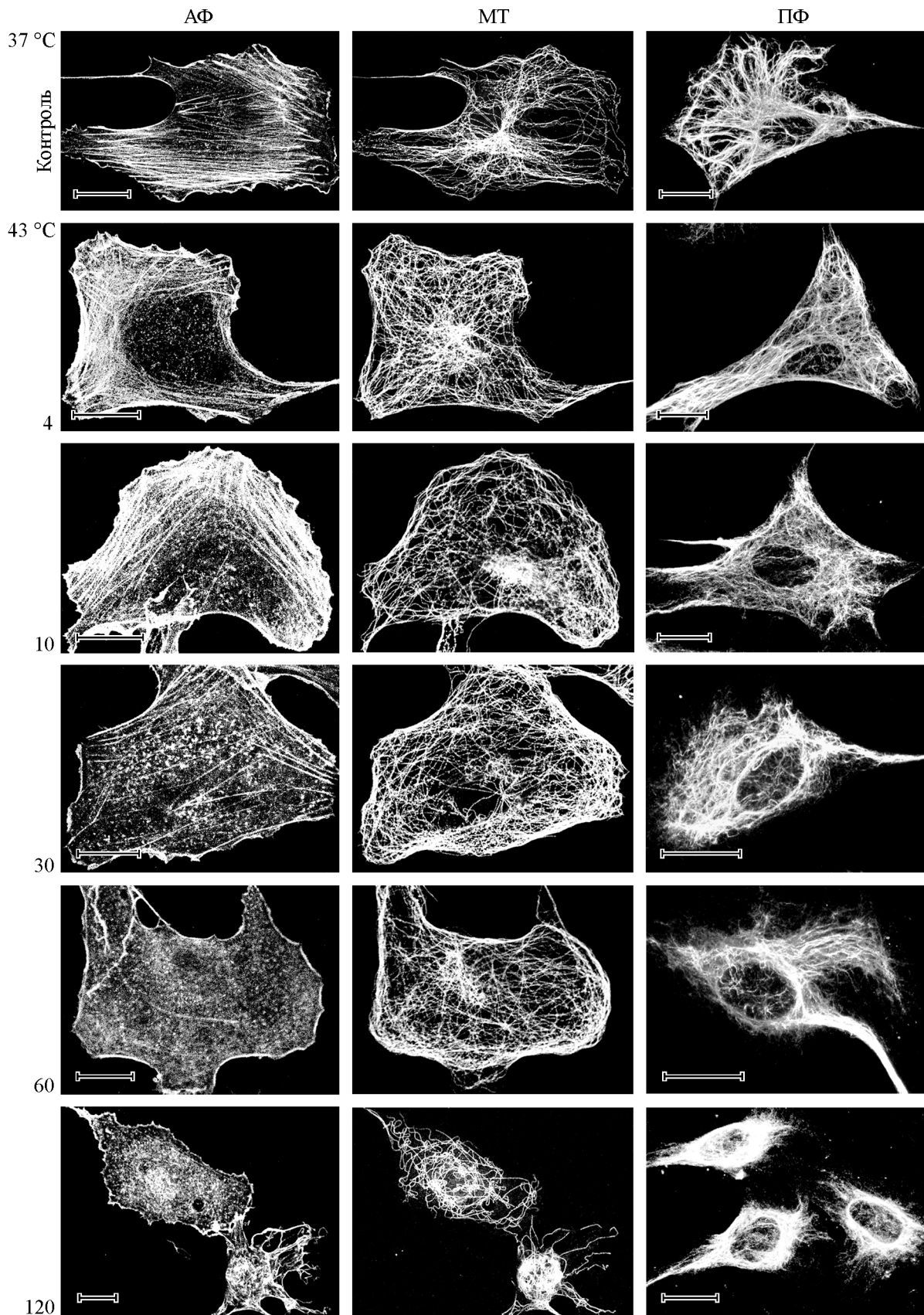


Рис. 1. Влияние гипертермии на морфологию цитоскелета в интерфазных постнатальных фибробластах крысы.

Динамика изменения морфологии цитоскелетных филаментов при 43 °С, содержащих полимеризованный актин (АФ, левая колонка), микротрубочек (МТ, средняя колонка) и виментинсодержащих промежуточных филаментов (ПФ, правая колонка). Контроль при 37 °С — характеризует цитоскелет клеток перед их нагреванием; 4, 10, 30, 60 и 120 — продолжительность гипертермии, мин. Масштабные отрезки — 20 мкм.

вали PBS 3 раза по 5 мин. В этом случае для разведения антител использовали раствор АТА с 0.05 % Тритона X-100. Для стандартизации условий окраски инкубацию клеток с антителами проводили в темноте в воздушном термостате при 37 °С в течение 60 мин. После окончания процедуры окраски клетки на стеклах отмывали от избытка антител PBS 3 раза по 5 мин и помещали в среду заключения Immuno-Fluore™ (ICN Biomedicals, Inc., США). Различий в морфологии цитоскелета после обработки фиксированных фибробластов 1 % Тритона X-100 на PBS или 0.05 % Тритона X-100 в растворе АТА замечено не было (ср. рис. 1 и 3 с рисунками в статьях Шестаковой и соавторов (Shestakova et al., 1991, 1993a, 1993b), где фиксированные фибробласты обрабатывали 1 % Тритона X-100). Контроли на специфичность без первых антител были отрицательными.

**Микроскопия.** Флуоресценцию окрашенных АФ, МТ и ИФ наблюдали, используя фотомикроскоп Аxiophot (Opton, Германия), снабженный эпифлуоресцентной оптикой и набором селективных фильтров для родамина и флуоресцеина, в этом случае для съемок использовали флюорографическую пленку РФ-3 (Тасма, Россия) (см. рис. 2) и лазерные сканирующие конфокальные микроскопы LSM-510 NLO (Carl Zeiss, Германия) (см. рис. 1) и TCS SP5 (Leica, Германия) (см. рис. 3), оборудованные Ar-лазером (488 нм) и HeNe-лазером (543 нм). Использовали объектив Plan-Neofluar 40×/1.3× или Plan-Apochromat 63×/1.40×, масляная иммерсия.

## Результаты

Главной задачей нашей работы было оценить влияние HS (43 °С) на состояние всех известных цитоскелетных структур в одном типе клеток — в нормальных интерфазных фибробластах (NEMF, NERF и NPRF). Нагревание от 37 до 43 °С длилось 11 мин. Такой постепенный переход от нормальной к температуре HS был выбран с целью исключить возможные искажения ответа клетки на тепловой шок, которые могли бы произойти при резком увеличении температуры в культуральной среде с растущими клетками. Клетки росли на покровных стеклах в специальных стерильных стаканчиках с культуральной средой. Стекла с клетками оставались в стаканах до конца опыта по HS. Только после фиксации и промывки стекла с клетками извлекали из стаканов для покраски.

Рис. 1 демонстрирует три типа цитоскелетных структур NPRF до HS (контроль, 37 °С) и при HS (43 °С). Сделаны снимки отдельно лежащих клеток, чтобы исключить возможное влияние клеточного контактного торможения на реакцию цитоскелета в условиях повышенной температуры.

АФ и МТ в одних и тех же клетках выявляли с помощью двойного окрашивания их фаллоидином для детекции АФ (рис. 1, левая колонка) и антителами к альфа-тубулину для выявления МТ (рис. 1, средняя колонка).

В контрольных клетках (37 °С) полимеризованный актин виден в структурах двух типов: это типичные пучки актиновых филаментов и некие небольшие образования, распределенные по всей клетке без какого-либо заметного порядка. Дополнительная проверка соседних оптических срезов по Z-координате показывала, как правило, что небольшие пятна с АФ не есть результат поперечных срезов пучков АФ. На оптических конфокальных срезах такие пятна, включающие в себя полиме-

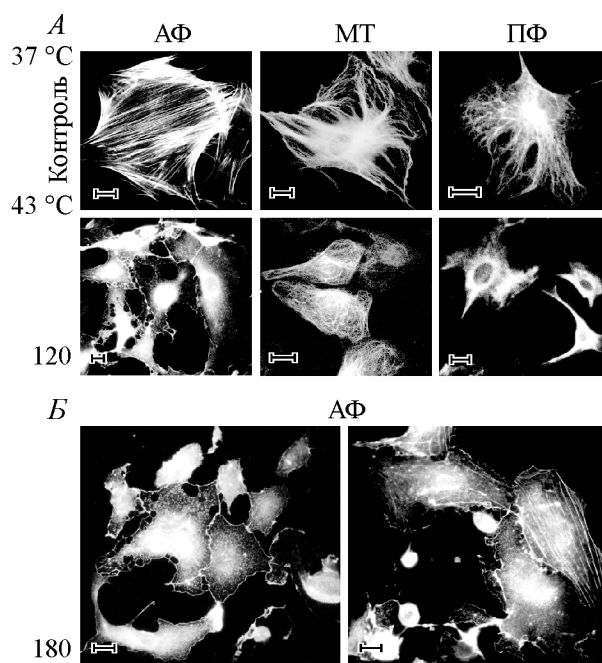


Рис. 2. Влияние гипертермии на морфологию цитоскелета в интерфазных фибробластах, изолированных из 19—21-суточных эмбрионов крыс.

А — цитоскелет при нормальных условиях культивирования клеток (контроль при 37 °С) и изменения морфологии цитоскелета после 120 мин при 43 °С. Морфология актинового цитоскелета (АФ, левая колонка), микротрубочек (МТ, средняя колонка) и виментинсодержащих промежуточных филаментов (ИФ, правая колонка). Б — морфология АФ после 180 мин при 43 °С: типичная картина (слева) и редкая, с клеткой, где видны пучки АФ (справа). Масштабные отрезки — 20 мкм.

ризованный актин, различались по размеру и морфологии и были похожи на округлые зернышки или короткие палочки.

Мы изучали динамику ответа АФ на HS (43 °С). Некоторые изменения во внутриклеточном распределении АФ можно было заметить уже в нулевой точке (43 °С) после 11-минутного прогревания клеток от 37 до 43 °С. Чаще всего они заключались в разборке некоторых внутриклеточных пучков АФ и в увеличении количества АФ-содержащих зерен. Обе тенденции наблюдали и при дальнейшем воздействии гипертермии. Так, после 30 мин при 43 °С основная часть внутриклеточных пучков АФ была разобрана и число зерен, содержащих АФ, увеличилось. Через 30—60 мин воздействия HS практически все внутриклеточные пучки АФ исчезли, и можно было наблюдать распад пучков АФ вдоль клеточного края. Что касается зерен АФ, то они претерпели изменения в размере и в морфологии: в цитоплазме видны образования с полимеризованным актином большего размера, чем зерна АФ до HS. Их генезис неясен. Через 30—60 мин инкубации при 43 °С большая часть клеток оставалась живой и удерживалась на покровных стеклах. Они сохраняли способность восстанавливать актиновый цитоскелет после возвращения к нормальной температуре (37 °С) (подробнее о реверсии см. ниже, рис. 3). После 120 мин при 43 °С большая часть внутренних и краевых пучков АФ была разобрана, одиночные клетки, как правило, не удерживались на подложке и большая их часть откреплялась от покровных стекол. Картины локализации АФ в удержавшихся на стеклах клетках после 120 мин HS были похожи на таковые после обработки клеток цитохалазином (Shes-

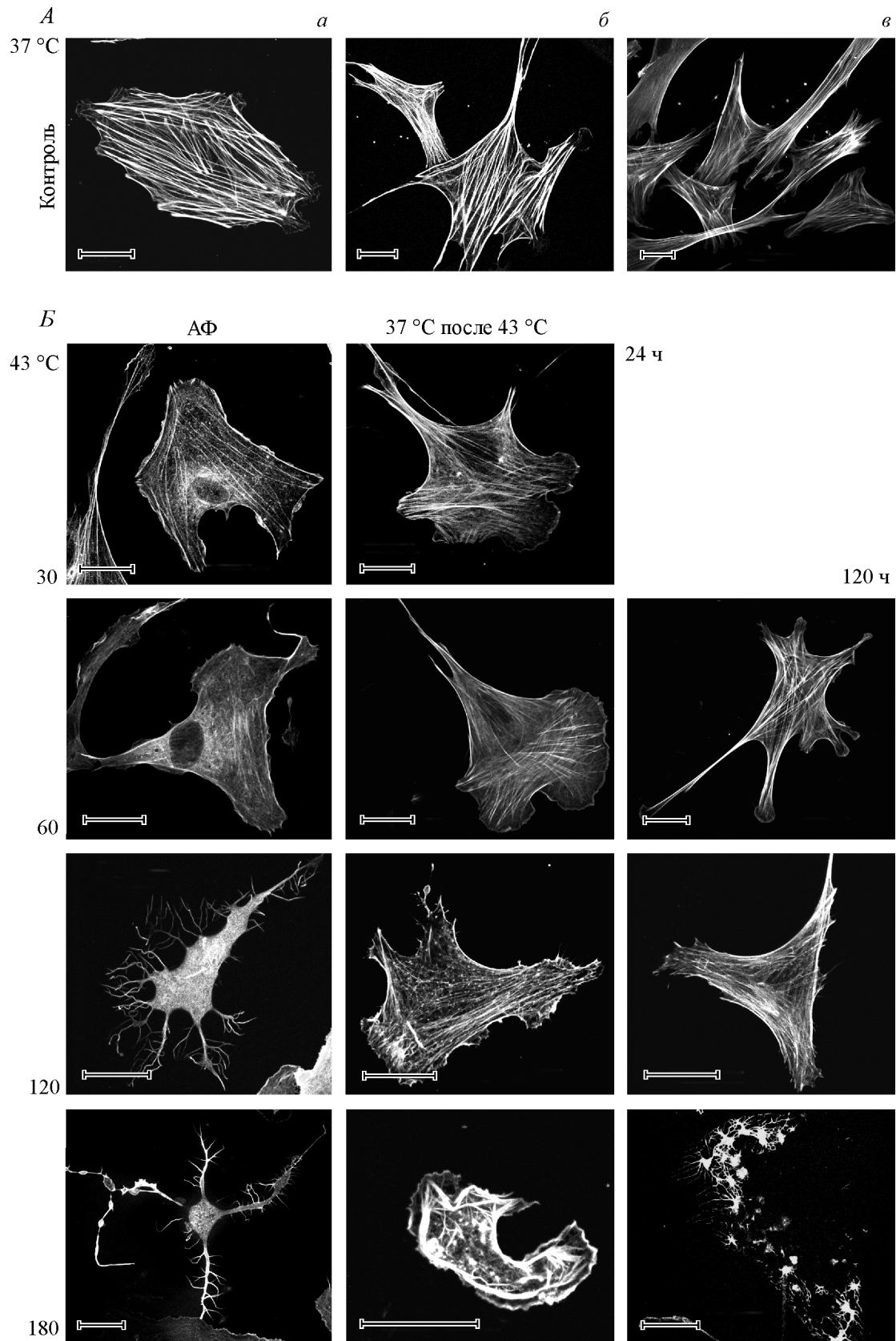


Рис. 3. Влияние реверсии от условий теплового шока (43 °С) к норме (37 °С) на состояние филаментов, содержащих полимеризованный актин (АФ), в нормальных интерфазных фибробластах, изолированных из 19–21-суточных эмбрионов мышей. А — морфология АФ в исходных клетках (а) и в той же популяции клеток через 24 (б) и 120 (в) ч; Б — динамика изменений АФ (левая колонка), АФ в той же популяции клеток после реверсии от 43 °С к норме (37 °С) через 24 (средняя колонка) и 120 (правая колонка) ч. 30, 60, 120 и 180 — продолжительность гипертермии, мин. Масштабные отрезки — 25 мкм.

takova et al., 1993b). В настоящее время неясно, каковы происхождение и состав зерен АФ и что означает их гетерогенность по морфологии и размеру. Являются они лишь остатками разобранных пучков АФ или зерна АФ гетерогенны по составу и происхождению? Эти вопросы требуют специального исследования.

Типичное распределение МТ в нормальных постнатальных фибробластах крысы видно в одной из контрольных клеток (37 °С) (рис. 1, *средняя колонка*). В этой клетке находится характерный для эукариот центр организации МТ, из которого основная часть МТ распределяется радиально по направлению к периферии клетки. Мы изучали динамику ответа МТ на HS (43 °С). Изменения в распределении МТ в фибробластах были заметны уже через 2—4 мин инкубации при 43 °С: деформировался центр организации МТ, МТ реорганизовывались, появлялись перекресты многих МТ, которые выглядели как небольшие (по сравнению с исходными клетками) центры организации МТ. Однако было установлено, что эти перекресты МТ не идентичны нормальным центрам организации МТ (Knox et al., 1991). Реорганизацию МТ в нормальных постнатальных фибробластах крыс можно было наблюдать на протяжении всего периода HS от 0 до 120 мин при 43 °С.

Морфологию виментиновых промежуточных филаментов (IF) наблюдали с помощью антител к виментину (клон V9), конъюгированных с Су3 (рис. 1, *правая колонка*). Контроль NPRF (37 °С) демонстрирует типичное распределение виментиновых IF в нормальных постнатальных фибробластах. Определенные изменения в морфологии IF можно было заметить уже через 4 мин инкубации клеток в условиях HS (43 °С). Реорганизация IF характеризовалась в основном двумя признаками: разборкой толстых пучков IF с появлением более тонких и укороченных филаментобразных структур и одновременным коллапсированием IF вокруг ядра.

Таким образом, данные рис. 1 показывают, что в нормальных постнатальных фибробластах крыс в условиях HS (43 °С) идет одновременная реорганизация всех известных цитоскелетных филаментов — АФ, МТ и IF. Изменения цитоскелета заметны уже после 2—4 мин пребывания клеток в условиях теплового шока. Подобная перестройка цитоскелета при 43 °С происходит также в фибробластах из 19—21-суточных эмбрионов крыс (рис. 2) и мышей (рис. 3, *левая колонка с АФ*).

Реверсию от условий HS (43 °С) к норме (37 °С) проводили, перемещая стаканчики с клетками на покровных стеклах из водяного ультратермостата (43 °С) в СО<sub>2</sub>-инкубатор (37 °С). Реверсия длилась 24 или 120 ч. Результаты реверсии оценивали по состоянию актинового цитоскелета. Локализацию полимеризованного актина наблюдали с помощью флуоресцентного фаллоидина. В опытах по реверсии использовали NEMF, NERF и NPRF.

Рис. 3 демонстрирует результаты реверсии NEMF от 43 к 37 °С. Видно, что поведение актинового цитоскелета при 43 °С практически не отличается в эмбриональных фибробластах из 19-суточных мышей от картины ответа цитоскелета на HS в NERF и NPRF (ср. рис. 3 с рис. 1 и 2 — *левые колонки*). Можно также видеть, что даже после 120 мин HS клетки не погибают, а остаются жизнеспособными и могут заново строить актиновый цитоскелет при 37 °С. Стоит обратить внимание также на агрегаты, содержащие полимеризованный актин: в условиях HS они группируются в основном вокруг ядра, а в условиях реверсии (37 °С) «зерна» АФ или распределяются по всей

цитоплазме, или их практически не видно. Возможно, что эти образования служат источником актина или затравкой для строительства новых АФ. Через 3 ч инкубации в условиях теплового шока на подложке остается очень мало клеток, так как большая их часть из-за разборки пучков АФ не может удержаться на подложке. По-видимому, их способность к построению АФ или резко снижается, или практически исчезает. Во всяком случае, через 120 ч при 37 °С после 3 ч при 43 °С закрепленные на стекле клетки остаются еще живыми, и на микрофотографиях иногда можно видеть в них «большие» агрегаты с полимерным актином, из которых торчат короткие тонкие АФ (рис. 3, *нижняя строка*, 120 ч при 37 °С после 180 мин при 43 °С).

## Обсуждение

Действительно ли ответ цитоскелета на тепловой шок зависит от типа клеток? Ответ цитоскелета на HS изучали, используя как нормальные, так и трансформированные клетки. Сходства в CHSR не было обнаружено. Этот факт позволил прийти к заключению о том, что «the cytoskeleton heat shock response is cell type dependent» (Coss, Linnemans, 1996). Мы решили проверить это утверждение.

В нашей таблице клетки разделены на две группы: нормальные клетки (так называемые первичные культуры) и музейные культуры, включающие в себя в основном трансформированные клетки.

Мы работали только с одним типом клеток — с первичными культурами нормальных фибробластов мыши, крысы и человека. Поэтому попробуем проанализировать прежде всего то, как цитоскелет нормальных пролиферирующих клеток отвечает на HS.

Данные, представленные в таблице, демонстрируют результаты опытов по влиянию HS на цитоскелетные филаменты в различных типах нормальных эукариотических клеток (фибробласты, эпителиальные клетки молочной железы мыши и Т-лимфоциты мыши). Видно, что ответы цитоскелета на HS не зависят от типа клеток. Это особенно отчетливо заметно в разбросе CHSR для одного и того же типа клеток — фибробластов цыпленка, крысы и человека — и внутри другого типа клеток — эпителиальных из молочной железы мыши. Создается впечатление, что CHSR зависит не от типа клеток, а от условий проведения опытов по HS и от интерпретации результатов разными авторами.

Анализ опубликованных данных обнаруживает прежде всего заметное несходство условий опытов. Например, использованная в экспериментах по HS температура колеблется от 40 до 45 °С. Однако динамика перестройки цитоскелета зависит от температуры: так, при 41 °С за 30 мин не было замечено каких-либо изменений в морфологии цитоскелета эпителиальных клеток молочной железы мышей, а при 43 и 45 °С за то же время отмечены реорганизации АФ и IF (Shyy et al., 1989) (см. таблицу). Кроме того, часто трудно судить о преобразованиях цитоскелета по микрофотографиям одной временной точки. Легче оценить результат, снимая динамику влияния HS на цитоскелет. Очевидно, что достоверными для сравнительного анализа CHSR у разных типов клеток могут быть данные, полученные в сходных условиях опыта, вместе с наблюдениями за ранней динамикой ответа цитоскелета на HS (см. рис. 1).

Судя по полученным нами результатам (рис. 1), морфологически легко определить, что происходит при 43 °С с актиновым цитоскелетом и с промежуточными филаментами: АФ разбираются, а ИФ коллапсируют вокруг ядра. Труднее отличить морфологию нормальных МТ от МТ, начинающих реорганизовываться.

Считалось, что ИФ располагаются вдоль МТ и как бы растянуты на них. Тогда коллапс ИФ может быть следствием разборки части МТ. Гипотеза о возможном взаимодействии МТ с ИФ была высказана в конце 1960-х годов. Было установлено, что деполимеризация МТ индуцирует коллапс ИФ (Ishikawa et al., 1968). Наши опыты подтвердили этот факт: разборка МТ нокодазолом сопровождалась коллапсом виментиновых ИФ в фибробластах мыши (Sheshtakova, Gavrilova, 1994). Возможно, что в условиях гипертермии (43 °С) происходит аналогичный процесс: микрофотографии на рис. 1 (средняя и правая колонки) показывают корреляцию между реорганизацией МТ и коллапсом виментиновых ИФ в крысиных фибробластах. Показано, что МТ удерживаются вдоль или вблизи виментиновых ИФ с помощью боковых цепей белка плектина (plectin sidearms) (Svitkina et al., 1996). Влияет ли HS непосредственно на плектин, разрушая опосредованную им связь между МТ и ИФ, или при 43 °С работает одновременно ансамбль механизмов, как отъединяющих МТ от ИФ, так и одновременно преобразующих и разбирающих МТ, пока неясно.

Так как наши результаты CHSR в NERF не совпадали с результатом Уэлша и Сухана (Welch, Suhan, 1985), мы решили повторить их опыты (рис. 2; см. таблицу). Нормальные первичные фибробласты 19-суточных эмбрионов крыс готовили по методике вышеупомянутых авторов. Уэлш и Сухан начинали опыт по HS с инкубации клеток при 42—43 ° в течение 5—10 мин, а затем клетки выдерживали при 42 °С в течение 3 ч. В наших опытах клетки до HS содержали при 37 °С и обрабатывали только нагретыми до 37 °С растворами. Нагревание от 37 до 43 °С занимало 11 мин, а затем температуру среды поддерживали в пределах 43.0 ± 0.1 °С от начала до конца эксперимента (см. раздел «Материал и методика»).

Результаты двух исследовательских групп не полностью совпадают. В наших опытах с NERF после 120 мин инкубации в условиях HS все типы цитоскелетных филаментов (АФ, МТ и ИФ) были реорганизованы: внутриклеточные АФ практически исчезли, МТ заметно изменили свою морфологию, а ИФ коллапсировали вокруг ядра (рис. 2, А). Схожие результаты наблюдали в опытах по HS с нормальными эмбриональными фибробластами мыши (см. таблицу; рис. 3, правая колонка), человека (Сперанская, Гаврилова, 1996) и крысы (рис. 1), а также в клетках NIH/3T3 Swiss (см. таблицу).

Уэлш и Сухан (Welch, Suhan, 1985) анализировали клетки, инкубированные только 180 мин при 42—43 °С. Их заключение об эффекте HS на NERF звучало так: число пучков АФ увеличивается, морфология МТ остается неизменной, в то время как ИФ подвергаются структурной перестройке и коллапсируют вокруг ядра (лишь последнее заключение относительно ИФ совпадает с нашим).

В наших опытах после 180 мин инкубации NERF при 43 °С основная часть клеток откреплялась и покидала покровные стекла. Однако некоторое количество небольших групп клеток можно было найти на стеклах. В этих клетках обычно практически не было пучков АФ. Клетки с АФ составляли, как правило, значительно меньше 1 % в

клеточной популяции, а чаще они полностью отсутствовали. Рис. 2, Б демонстрирует состояние пучков АФ после 180 мин инкубации при 43 °С: типичная картина (слева) и очень редкая (справа), где некоторые клетки еще содержат собранные пучки АФ. Можно предположить ряд причин присутствия или появления de novo пучков АФ после длительного (180 мин) пребывания клеток в условиях теплового шока: гетерогенность клеточной популяции до HS, наличие клеток, толерантных к HS, клеточная селекция в условиях гипертермии, формирование заново пучков АФ в условиях HS и т. д.

Предстоит выяснить, означает ли разброс в значениях CHSR, что утверждение Косса и Линнеманса «CHSR is cell type dependent» (Coss, Linnemans, 1996) ошибочно или наблюдаемые результаты есть следствие различий в условиях опыта и неверных интерпретаций. В условиях, которые мы использовали, гипертермия индуцировала одновременно перестройки всех известных цитоскелетных филаментов в нормальных фибробластах из мышей, крыс и человека, а также в клетках NIH/3T3 Swiss (см. таблицу).

Таким образом, все вышеизложенное позволяет сделать заключение о том, что вопрос о сходстве или различии ответа цитоскелета в одном и том же или в разных типах эукариотических клеток на тепловой шок пока нельзя считать решенным. В некоторых случаях необходимы повторные исследования, а также дальнейшее изучение проблемы CHSR у эукариот.

Цитоскелет присутствует в разных типах эукариотических клеток. Структуры известных цитоскелетных филаментов (АФ, МТ и ИФ), основной набор белков, включенных в их конструкции, механизмы сборки—разборки цитоскелета, как и хореография МТ во время организации митотического веретена, практически универсальны для разных типов эукариотических клеток. Сравнительно недавно обнаружен и изучен бактериальный цитоскелет. К настоящему времени найдены бактериальные гомологи всех трех типов элементов цитоскелета эукариот — тубулина, актина и промежуточных филаментов (Shih, Rothfeld, 2006). Можно думать, что цитоскелет — это консервативная и, возможно, универсальная клеточная система.

Наше изучение динамики ответа цитоскелета на HS показало, что реорганизация разных типов цитоскелетных филаментов протекает одновременно и ее можно заметить через 2—4 мин инкубации клеток в условиях теплового шока (в наших опытах 43 °С). Напрашивается предположение о том, что такая «быстрая» перестройка цитоскелета при HS может быть необходимой для реализации нормального механизма защиты интерфейсных клеток от гипертермии. Есть данные о возможном сопряжении «быстрой» реорганизации цитоскелета с быстрой реорганизацией белоксинтезирующей системы при HS. Это может приводить к репрограммированию рибосом и началу синтеза белков теплового шока (Lindquist, 1987; Сперанская, Гаврилова, 1996).

Мы благодарим проф. А. С. Спирина за интерес, проявленный к нашей работе. Мы также признательны В. Б. Садовникову за помощь в организации работы с животными и В. П. Бурмистровой за техническую помощь.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 93-04-21141, 96-04-50643 и 01-04-48322).



## Список литературы

- Сперанская С. П., Гаврилова Л. П. 1996. Изучение влияния теплового шока на состояние цитоскелета и полисом в диплоидных фибробластах кожи человека. Цитология. 38 (2) : 250—251.
- Cheng T.-J., Lai Y.-K. 1994. Transient increase in vimentin phosphorylation and vimentin-HSC70 association in 9L rat brain tumor cells experiencing heat-shock. J. Cell. Biochem. 54 : 100—109.
- Collier N. C., Schlesinger M. J. 1986. The dynamic state of heat shock proteins in chicken embryo fibroblasts. J. Cell. Biol. 103 : 1495—1507.
- Coss R. A., Linnemans W. A. M. 1996. The effects of hyperthermia on the cytoskeleton: a review. Int. J. Hyperthermia. 12 : 173—196.
- Gavrilova L. P., Rutkevitch N. M., Gelfand V. I., Motuz L. P., Stahl J., Bommer U.-A., Bielka H. 1987. Immunofluorescent localization of protein synthesis components in mouse embryo fibroblasts. Cell Biol. Int. Rep. 11 : 745—753.
- Glass J. R., DeWitt R. G., Cress A. E. 1985. Rapid loss of stress fibers in Chinese hamster ovary cells after hyperthermia. Cancer Res. 45 : 258—262.
- Hesketh J. E., Horne Z., Campbell G. P. 1991. Immunohistochemical evidence for an association of ribosomes with microfilaments in 3T3 fibroblasts. Cell Biol. Int. Rep. 15 : 141—150.
- Hesketh J. E., Pryme I. F. 1991. Interaction between mRNA, ribosomes and the cytoskeleton. Biochem. J. 277 : 1—10.
- Iida K., Iida H., Yahara I. 1986. Heat shock induction of intranuclear actin rods in cultured mammalian cells. Exp. Cell Res. 165 : 207—215.
- Ishikawa H., Bischoff R., Holtzer H. 1968. Mitosis and intermediate-sized filaments in developing skeletal muscle. J. Cell Biol. 38 : 538—555.
- Kitano Y., Okada N. 1990. Organization and disorganization of actin filaments in human epidermal keratinocytes: heat-shock treatment and recovery process. Cell Tissue Res. 261 : 269—274.
- Knox J. D., Mitchel R. E. J., Brown D. L. 1991. Effects of hyperthermia on microtubule organization and cytolytic activity of murine cytotoxic T lymphocytes. Exp. Cell Res. 194 : 275—283.
- Laszlo A. 1992. The effects of hyperthermia on mammalian cell structure and function. Review series. Cell Proliferation. 25 : 59—87.
- Lindquist S. 1980. Translational efficiency of heat-induced messages in *Drosophila melanogaster* cells. J. Mol. Biol. 137 : 151—158.
- Lindquist S. 1987. Translational regulation in the heat-shock response of *Drosophila* cells. In: Translational regulation of gene expression. New York; London: Plenum Press. 187—207.
- Miron T., Vancompernelle K., Vandekerckhove J., Wilchek M., Geiger B. 1991. A 25-kD inhibitor of actin polymerization is a low molecular mass heat shock protein. J. Cell Biol. 114 : 255—261.
- Ohtsuka K., Liu Y.-C., Kaneda T. 1993. Cytoskeletal thermotolerance in NRK cells. Int. J. Hyperthermia. 9 : 115—124.
- Shestakova E. A., Gavrilova L. P. 1994. In G<sub>0</sub>-arrested cells eukaryotic elongation factor 2 remains to co-localize with intermediate filaments after microtubule disassembly. Cell Biol. Int. Rep. 18 : 434.
- Shestakova E. A., Motuz L. P., Gavrilova L. P. 1993a. Co-localization of components of the protein-synthesizing machinery with the cytoskeleton in G<sub>0</sub>-arrested cells. Cell Biol. Int. Rep. 17 : 417—424.
- Shestakova E. A., Motuz L. P., Minin A. A., Gavrilova L. P. 1993b. Study of localization of the protein-synthesizing machinery along actin filament bundles. Cell Biol. Int. Rep. 17 : 409—416.
- Shestakova E. A., Motuz L. P., Minin A. A., Gelfand V. I., Gavrilova L. P. 1991. Some of eukaryotic elongation factor 2 is co-localized with actin microfilament bundles in mouse embryo fibroblasts. Cell Biol. Int. Rep. 15 : 75—84.
- Shih Y.-L., Rothfield L. 2006. The bacterial cytoskeleton. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70 : 729—754.
- Shyy T. T., Asch B. B., Asch H. L. 1989. Concurrent collapse of keratin filaments, aggregation of organelles, and inhibition of protein synthesis during the heat shock response in mammary epithelial cells. J. Cell Biol. 108 : 997—1008.
- Singer R. H., Langevin G. L., Lawrence J. B. 1989. Ultrastructural visualization of cytoskeletal mRNAs and their associated proteins using double-label *in situ* hybridization. J. Cell Biol. 108 : 2343—2353.
- Svitkina T. M., Verkhovskiy A. B., Borisy G. G. 1996. Plectin sidearms mediate interaction of intermediate filaments with microtubules and other components of cytoskeleton. J. Cell Biol. 135 : 991—1007.
- Toh B., Lolait S., Mathy J., Baum R. 1980. Association of mitochondria with intermediate filaments and of polyribosomes with cytoplasmic actin. Cell Tissue Res. 211 : 163—169.
- Van Bergen en Henegouwen P. M. P., Jordi W. J. R. M., van Dongen G., Ramaekers F. C. S., Amesz H., Linnemans W. A. M. 1985. Studies on a possible relationship between alterations in the cytoskeleton and induction of heat shock protein synthesis in mammalian cells. Int. J. Hyperthermia. 1 : 69—83.
- Van Bergen en Henegouwen P. M. P., Linnemans W. A. M. 1987. Heat shock gene expression and cytoskeletal alterations in mouse neuroblastoma cells. Exp. Cell Res. 171 : 367—375.
- Welch W. J., Suhan J. P. 1985. Morphological study of the mammalian stress response: characterization of changes in cytoplasmic organelles, cytoskeleton and nucleoli, and appearance of intranuclear actin filaments in rat fibroblasts after heat-shock treatment. J. Cell Biol. 101 : 1198—1211.

Поступила 8 II 2012

## HEAT SHOCK INDUCES SIMULTANEOUS REARRANGEMENTS OF ALL KNOWN CYTOSKELETAL FILAMENTS IN NORMAL INTERPHASE FIBROBLASTS

L. P. Gavrilova,<sup>1,\*</sup> I. I. Korpacheva,<sup>1</sup> S. G. Semushina,<sup>2</sup> V. A. Yashin<sup>3</sup><sup>1</sup> Institute of Protein Research RAS,<sup>2</sup> Branch of M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry and <sup>3</sup> Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino, Moscow Region;

\* e-mail: lpg@vega.protres.ru

We studied the cytoskeleton heat shock response (CHSR) in normal interphase embryonic (NERF) and postnatal rat fibroblasts (NPRF) using fluorescent microscopy. Incubation of the cells at 43 °C resulted in reorganization of the cytoskeleton. CHSR in NERF and in NPRF were similar. Under heat shock, the bundles of actin filaments disassembled, microtubule morphology changed remarkably, and intermediate filaments collapsed

around the nucleus. After 30—120 minutes at 43 °C, the cells were still capable of regaining the actin cytoskeleton after the temperature returned to normal (37 °C). Analysis of CHSR dynamics showed that rearrangements of different types of the cytoskeletal filaments proceeded simultaneously, and they were visible after 2—4 minutes. We believe that the cytoskeleton reorganization under heat shock can be of vital importance in cell protection against temperature stress. There are data about possible conjugation of CHSR with the rearrangement of the protein synthesizing system, which results in synthesis of heat shock proteins.

Key words: cytoskeleton, heat shock, normal embryonic and postnatal fibroblasts, fluorescent microscopy.

---