

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

(Санкт-Петербург, 15—16 мая 2012 г.)

ИЗУЧЕНИЕ КРАСНОГО ПИГМЕНТА ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* КАК ПОТЕНЦИАЛЬНОГО АГЕНТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АМИЛОИДОЗОВ. © А. В. Артемов, Е. В. Михайлова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, art04@list.ru.

Существует ряд заболеваний человека и животных, которые принято называть «конформационными». Они связаны с нарушением пространственной нативной структуры некоторых белков, их агрегацией и образованием амилоидных фибрилл. Сейчас известно более 20 подобных заболеваний. К их числу относятся многочисленные губчатые энцефалопатии, болезни Альцгеймера, Хантингтона, Паркинсона, диабет II типа и др. Некоторые из этих заболеваний являются инфекционными, причем переносчиками инфекции служат амилоидные фибриллы, которые в этом случае называются прионами (**pr**otei**n**aceous — белковый, **in**fective — инфекционный, **on** — в значении частица).

Открытие прионов у одноклеточного микроорганизма дрожжей создало новые возможности для изучения «конформационных» заболеваний благодаря широкому использованию эффективных методов молекулярной генетики *in vivo*.

В результате экспериментов со штаммами дрожжей *S. cerevisiae*, накапливающих дрожжевой прион [*PSI⁺*], нами были получены данные, свидетельствующие о том, что красный пигмент дрожжей-сахаромицетов может быть перспективным кандидатом на роль фармакологического антиамилоидного средства.

В ходе проведенной работы была разработана методика оценки уровня амилоидов в дрожжевых клетках, включающая в себя выделение фракции, обогащенной амилоидом, и измерение флуоресценции при добавлении к ней красителя тиофлавина Т, специфически связывающегося с амилоидными белками. С использованием данной методики нами было показано, что накопление красного пигмента в результате мутации в генах *ADE1* и *ADE2* в дрожжевых клетках приводит к снижению количества белков в осадочной фракции, взаимодействующих с тиофлавином Т. Полученные данные были подтверждены результатами электрофорезов в агарозном и полиакриламидном гелях.

Сравнение осадочных фракций, выделенных из красных и белых изогенных штаммов в 2D-электрофорезе с последующим масс-спектроскопическим анализом, позволило идентифицировать 23 пигментзависимых белка, среди которых преобладают шапероны и белки, участвующие

в метаболизме глюкозы. Предполагается, что красный пигмент, связываясь с амилоидными фибриллами, препятствует образованию прионовых агрегатов, а нарушение связи фибрилл с шаперонами приводит к подавлению размножения прионов.

В ходе проведенной работы изучалось влияние красного пигмента на образование фибрилл *in vitro*. В частности, в экспериментах с растворами модельных белков инсулина и лизоцима удалось установить, что добавление красного пигмента в раствор снижает интенсивность флуоресценции тиофлавина Т, что свидетельствует о замедлении образования и уменьшении размеров белковых фибрилл. Электронная микроскопия позволила установить, что добавление красного пигмента влияет на образование фибрилл инсулина и лизоцима, уменьшает их размер.

Литературный поиск показал, что красный пигмент дрожжей *S. cerevisiae* как агент, влияющий на образование амилоидов, ранее в научных публикациях представлен не был.

ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКА СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК КАК ВЕРОЯТНЫЙ ИСТОЧНИК ВОССТАНОВЛЕНИЯ НЕДОСТАЮЩИХ СТРУКТУР ПРИ БЕСПОЛОМ РАЗМНОЖЕНИИ У АННЕЛИД. © Р. А. Бабаханова, Н. П. Смирнова, Р. П. Костюченко. С.-Петербургский государственный университет, r.babakhanova@gmail.com.

Одной из наиболее интересных и пока еще малоизученных проблем на стыке клеточной биологии и биологии развития является проблема клеточной и тканевой пластичности, ограниченности потенций клеток и обратимости их дифференцировки у различных животных. Такие процессы, как регенерация и бесполое размножение, являются уникальными моделями для изучения данных вопросов. Объекты нашего исследования, олигохеты семейства Naididae — *Pristina longiseta* и *Nais communis* — демонстрируют высокую способность к регенерации и размножаются в культуре исключительно поперечным делением по типу паратомии, при котором формирование передних и задних структур дочерних особей предшествует их разделению.

Ингибиторный анализ, иммуноцитохимическое выявление фосфогистона H3, а также эксперименты с включением BrdU позволяют утверждать, что клеточным источником образования новых головных и хвостовых структур

тур главным образом являются эктодермальные клетки покровов в пределах сегмента, несущего зону деления. В предыдущих исследованиях на гистологическом уровне нами было показано, что они принимают вид малодифференцированных. Характер включения BrdU меняется по мере прохождения стадий паратомии. На ранних стадиях большая часть метки выявляется в покровном эпителии, позже сигнал распространяется и на интенсивно формирующиеся внутренние бластемные клеточные массы, вероятно, возникающие за счет выселения малодифференцированных клеток покровов. По мере закладки головных структур и зоны роста BrdU выявляется и в кишечном эпителии зоны деления и последующего сегмента, что свидетельствует о трансформации кишки перед разделением вновь сформированных зооидов. Таким образом, тканевые перестройки затрагивают не только покровный, но и кишечный эпителий.

В качестве молекулярных маркеров стволовых и малодифференцированных клеток нами были использованы гомологи генов *piwi*, *vasa* и *pl10*. Показана специфичная активность всех трех генов в предпигидиальной зоне роста и перетяжке. В зоне паратомии экспрессия генов *piwi*, *vasa* и *pl10* возникает *de novo* в покровном эпителии, а динамика паттернов их экспрессии коррелирует с процессами дедифференцировки и выселения клеток покровного эпителиа, образования в зоне паратомии массы недифференцированных клеток и формирования структур дочерних зооидов. Полученные данные говорят в пользу предположения о происхождении клеточного материала недостающих частей дочерних зооидов за счет дедифференцировки соматических тканей в пределах зоны паратомии, что, вероятно, свидетельствует о высокой тканевой пластичности исследованных объектов. В данном случае обратимость дифференцировки соматических клеток могла бы обеспечивать возможность поддержания популяции этих животных в течение большого количества поколений в условиях отсутствия полового размножения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00866-а).

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОСЛЕ ИНФАРКТА МИОКАРДА. © *Е. В. Байдюк, О. В. Коршак, Ю. И. Ансим, Г. А. Сакута.* Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, katya_bay@mail.ru.

Ишемическая болезнь сердца, в частности ее наиболее тяжелая клиническая форма — инфаркт миокарда, является основной причиной смертности во многих странах мира. Однако любое заболевание является системным, и при инфаркте миокарда поражается не только сердце, но также легкие, почки, печень и другие органы. Известно, что повреждения печени при сердечных заболеваниях варьируют от кратковременных функциональных изменений до кардиального цирроза. В данной работе мы исследовали динамику морфофункциональных изменений популяции гепатоцитов крыс на разных сроках после экспериментального инфаркта миокарда, полученного методом перманентного лигирования левой коронарной артерии. В качестве контроля использовались ложнооперированные крысы, у которых выполняли торакотомию без коронароокклюзии, а также одновозрастные интактные животные.

Для определения функционального статуса печени мы измеряли содержание гликогена в гепатоцитах через 2 и 6 нед после операции. Количественное определение гликогена в клетках проводили с помощью импульсного микрофлуориметра РИФ-1 на препаратах-мазках, окрашенных с помощью флуоресцентного варианта PAS-реакции. Получили, что через 2 нед после инфаркта количество гликогена в гепатоцитах прооперированных животных на 60 % превышало таковое в контроле. Через 6 нед после экспериментального воздействия количество гликогена в гепатоцитах контрольных и подопытной групп не различалось. Гипертрофия и полиплоидизация гепатоцитов играют важную роль в постнатальном и репаративном росте печени. В данной работе гипертрофию гепатоцитов оценивали по сухой массе клеток, которую измеряли на препаратах-мазках изолированных гепатоцитов с помощью интерференционного микроскопа МБИН-4. Получено, что сухая масса гепатоцитов крыс с экспериментальным инфарктом миокарда через 2 нед после операции не отличается от контроля, тогда как через 6 нед после инфаркта сухая масса гепатоцитов прооперированных крыс на 50 % выше, чем в контроле. Для определения плоидности гепатоцитов препараты окрашивали по Фельгену. Содержание ДНК в ядрах гепатоцитов определяли с помощью флуоресцентной цитофотометрии, используя для этого анализатор изображений «Видеотест». Однако изменений уровня плоидности гепатоцитов в ходе регенераторного ответа печени обнаружено не было. Таким образом, функциональные изменения печени наблюдаются на ранних сроках после инфаркта миокарда, а репаративные процессы (гипертрофия) выявляются на более поздних стадиях.

ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ p-CREB, c-Fos и NIF-1 В МОЗГЕ КРЫС УЧАСТВУЮТ В ФОРМИРОВАНИИ ТРЕВОЖНО-ДЕПРЕССИВНЫХ СОСТОЯНИЙ, А ТАКЖЕ В ИХ ПРЕДОТВРАЩЕНИИ С ПОМОЩЬЮ ГИПОКСИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ. © *К. А. Баранова.* Институт физиологии им. акад. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, ksentipra@mail.ru.

Транскрипционные факторы (ТФ) играют важную роль в организации стрессорного ответа организма, регулируя активность широкого спектра генов. Цель данного исследования состояла в анализе вовлечения ТФ из трех семейств в формирование адаптивных и патологических реакций организма на неизбежный психоэмоциональный и травматический стрессы. Изучали динамику активации ТФ CREB, c-Fos и NIF-1 в образованиях мозга крыс: 1) в ответ на неизбежный психоэмоциональный стресс в модели «выученной беспомощности» (ВБ); 2) в ответ на травматический стресс в модели посттравматического стрессового расстройства (ПТСР) — парадигме «стресс-рестресс»; 3) после применения гипоксического прекондиционирования (ГП), способствующего адаптации к данным видам стресса и предотвращающего развитие постстрессовых патологий. Формирование постстрессовых тревожно-депрессивных патологий у крыс сопровождалось низким уровнем экспрессии фосфорилированной формы CREB в гипоталамусе и гиппокампе. У ГП-животных в этих же условиях обнаруживалось повышение содержания p-CREB, особенно в отсроченный период. Таким образом, очевидно, что недостаточная активация этого ТФ отражает дезадаптивную реакцию на тяжелый стресс, в то время как пролонгированное

фосфорилирование CREB, очевидно, необходимо для запуска адаптационных процессов. В отличие от CREB факторы c-Fos и HIF-1 индуцировались в гипоталамусе, гиппокампе и неокортексе как при развитии ВБ и ПТСР, так и при адаптации к патогенным стрессам, однако динамика экспрессии ТФ в этих двух случаях существенно различалась. При патологических реакциях на стресс выявлялось значительное и пролонгированное повышение содержания факторов во всех исследованных областях мозга крыс, однако у ГП-животных, адаптирующихся к стрессу, оверэкспрессия HIF-1 α и c-Fos в отдаленный период нивелировалась. Результаты свидетельствуют о том, что недостаточная активация фактора CREB и отсроченная сверхэкспрессия HIF-1 α и c-Fos в нейронах мозга могут носить патогенетический характер, а направленная коррекция этих нарушений путем ГП представляется перспективной стратегией повышения адаптационного потенциала организма в условиях тяжелых стрессов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 10-04-00371).

ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА НА СОКРАТИТЕЛЬНЫЙ АППАРАТ КАРДИОМИОЦИТОВ. © Н. Б. Бильдюг, Г. П. Пинаев. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, relapse@yandex.ru.

В процессе культивирования кардиомиоцитов новорожденных и взрослых крыс происходит постепенное преобразование типичных миофибрилл в структуры, напоминающие по морфологии стресс-фибриллы немышечных клеток, с последующим восстановлением их исходного строения. Обнаруженные перестройки могут быть связаны с потерей клетками естественного микроокружения при переводе их в культуру, тогда как восстановление миофибриллярных структур после длительного культивирования кардиомиоцитов может объясняться постепенной наработкой соответствующего для них внеклеточного матрикса или других факторов. Чтобы установить, зависит ли состояние сократительного аппарата кардиомиоцитов от внеклеточного матрикса, кардиомиоциты наносили и культивировали на внеклеточном матриксе, нарабатанном сердечными фибробластами. При этом перестройка сократительного аппарата кардиомиоцитов начиналась на более поздних сроках, а обратная сборка происходила раньше по сравнению с контрольными клетками. Чтобы выяснить, какие белки внеклеточного матрикса могут быть ответственными за такое влияние, кардиомиоциты культивировали на отдельных иммобилизованных белках внеклеточного матрикса, таких как ламинин 2/4 и фибронектин. В обоих случаях наблюдалось аналогичное сокращение времени, в течение которого происходила реорганизация сократительного аппарата кардиомиоцитов. Чтобы сопоставить полученные данные с действием на сократительный аппарат растворимых факторов, кардиомиоциты культивировали в кондиционированной среде от сердечных фибробластов. При этом не наблюдалось каких-либо изменений по сравнению с контрольными кардиомиоцитами. Таким образом, согласно полученным результатам, внеклеточный матрикс сердечных фибробластов влияет на динамику сократительного аппарата кардиомиоцитов в культуре, способствуя более длительному поддержанию его типичной

организации, тогда как растворимые факторы, продуцируемые фибробластами, не оказывают существенного влияния на этот процесс. При культивировании кардиомиоцитов на белках внеклеточного матрикса не наблюдалось полного сохранения исходной структуры их сократительного аппарата. По-видимому, его состояние также определяется другими факторами микроокружения.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ КОНЪЮГАТЫ ОЛИГОАРГИНИНА С ЛИГАНДОМ РЕЦЕПТОРА CXCR4 КАК СРЕДСТВА АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ В КЛЕТКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ. © М. С. Богачева, А. А. Егорова, А. В. Киселев. С.-Петербургский государственный университет, bogachevamaru@gmail.com.

Для генной терапии наиболее актуальной является проблема адресной доставки генетических конструкций (ГК) в клетки и ткани организма. Перспективными средствами доставки являются синтетические пептидные носители, способные обеспечивать тканеспецифичный перенос ГК посредством механизма рецепторопосредованного эндоцитоза. CXCR4 — хемокиновый рецептор фактора миграции стволовых клеток SDF-1, представленный на поверхности некоторых типов стволовых и опухолевых клеток. Данная лиганд-рецепторная пара участвует в процессах гематопоэза, кардиогенеза, миграции стволовых клеток и клеток иммунной системы, а также играет важную роль при развитии раковых заболеваний и ВИЧ-инфекции. Цель данного исследования — изучение пептидных носителей, модифицированных лигандом хемокинового рецептора CXCR4, как средств направленной доставки генных конструкций в клетки млекопитающих. В работе исследованы цистеин-богатый аргининсодержащий носитель CLPR6 (CHRRRRRRHC), его аналог, модифицированный лигандом к рецептору CXCR4, — L1 (KPVSLYSRSPSRFFESH-Ahx-Ahx-CHRRRRRRHC) и две комбинации пептидов L1 и CLPR6. В носителе L2 50 mol % молекул содержат сигнал к рецептору, а в носителе L3 — только 10 mol %.

Способность пептидов формировать комплексы с ДНК была показана с помощью ДНК-ретардации, тестов на вытеснение бромистого этидия и красителя SybrGreen. Чувствительность комплексов ДНК/носитель к поверхностным гликозамингликанам изучали с помощью декстрансульфатного теста. Для изучения защиты плазмидной ДНК в составе комплексов от нуклеазной дегградации использовали тест на чувствительность ДНК к ДНКазе I. Трансфекционную активность комплексов изучали на трех линиях клеток с разным содержанием рецептора CXCR4 на поверхности: HeLa и A172 (CXCR4+) и CHO (CXCR4-). В качестве репортерного использовали ген *lacZ*. Специфичность проникновения оценивали с помощью трансфекции в присутствии хлорпромазина — ингибитора рецептор-опосредованного эндоцитоза. Токсичность комплексов ДНК/носитель оценивали с помощью красителя Alamar Blue.

Показано, что включение молекул лиганда увеличивает ДНК-компактизирующую способность носителей L1, L2 и L3, увеличивает чувствительность нуклеопептидных комплексов к гликозамингликанам и увеличивает ДНК-защитные свойства данных носителей. В экспериментах по трансфекции показано, что модификация носителя лигандом рецептора CXCR4 увеличивает трансфекционную активность комплекса ДНК/носитель на

CXCR4(+)-клетках HeLa и A172. В ряде экспериментов эффективность трансфекции клеток CXCR4(+) комплексами ДНК с лигандсодержащими пептидами в 10 раз превышала эффективность комплексов ДНК/полиэтиленмин. В присутствии хлорпромазина трансфекционная активность комплексов ДНК/L1 на клетках A172 достоверно уменьшалась. На CXCR4(-)-клетках CHO эффективность комплексов ДНК с немодифицированным и модифицированными соединениями достоверно не различалась. Был сделан вывод о том, что комплексы носителей L1, L2, L3 и ДНК способны избирательно трансфицировать клетки, на поверхности которых представлен рецептор CXCR4.

Таким образом, использование пептидов, модифицированных лигандом рецептора CXCR4, является перспективным для разработки эффективных и специфичных средств доставки ДНК в клетки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-01236-а).

WNT-СИГНАЛИНГ В ЭПИТЕЛИАЛЬНОМ МОРФОГЕНЕЗЕ ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ *OSCARILLA LOBULARIS* (PORIFERA). © И. Е. Борисенко, А. В. Ересковский. С.-Петербургский государственный университет, ilja.borisenko@gmail.com.

Сигнальный путь Wnt контролирует такие процессы, как пролиферация, дифференцировка и миграция клеток в ходе различных морфогенезов у Metazoa, занимающих положение между губками и хордовыми в филогенетическом древе. В частности, у губок (Porifera), занимающих ключевое положение в основании древа, было показано участие лиганда Wnt в формировании остий (принносящих пор водоносной системы). В работе была использована *Oscarella lobularis*, представитель наиболее продвинутого класса губок — Homoscleromorpha, обладающая типичным для Metazoa эпителием с базальной мембраной. Работу канонического пути Wnt нарушали с помощью активаторов (броминдирубиноксима, ингибитора киназы β гликогенсинтазы) и ингибиторов (IWR-1, стабилизирующий аксин в комплексе деградации бета-катенина; PNU-74654, связывающий бета-катенин и не допускающий рекрутирования им транс-активатора TCF/Lef). Использование различных ингибиторов, работающих на разных участках канонического пути Wnt, вызвано эволюционной нестабильностью элементов пути внутри таксона Porifera. Так, ранее было показано, что в геноме *Sycon ciliatum* отсутствует ген аксина, обязательный для канонического пути. Сканирующее электронно-микроскопическое исследование регенерирующей *O. lobularis* показало, что эктопическая активация Wnt вызывает усиленное формирование остий на регенерирующей поверхности, тогда как ингибирование данного сигнального пути стимулирует образование пальцевидных выростов экзопинакодермы раневой поверхности. Выросты имеют толщину 5—10 клеток, направлены перпендикулярно раневой поверхности и часто анастомозируют между собой тяжами толщиной 2—3 клетки. Клетки, находящиеся на апикальной поверхности выроста, имеют множественные короткие выросты цитоплазматической мембраны, напоминающие микроворсинки и свидетельствующие о повышенной двигательной активности клетки. Учитывая прогрессивную

«метазойную» организацию эпителия *Oscarella*, мы можем выдвинуть предположение о нахождении эпителиальной ткани под постоянным действием как минимум двух антагонистически направленных сигналов — Wnt, вызывающего инвагинацию пласта, и другого (неизвестного), вызывающего эвагинацию. При этом ослабление одного сигнала обеспечивает усиленное проявление другого.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда исследований (проекты 09-04-00337-а и 10-04-91053-НЦНИ-а).

СНИЖЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК И НАРУШЕНИЕ РАДИАЛЬНОЙ МИГРАЦИИ НЕЙРОБЛАСТОВ В ФОРМИРУЮЩУЮСЯ КОРТИКАЛЬНУЮ ПЛАСТИНКУ МОЗГА КРЫС, ПЕРЕНЕСШИХ ПРЕНАТАЛЬНУЮ ГИПОКСИЮ НА E14. © Д. С. Васильев, Н. Л. Туманова, И. А. Журавин. Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, dvasilyev@bk.ru.

Работа выполнена с целью выявления причины нарушения клеточного состава неокортекса в раннем постнатальном онтогенезе крыс, перенесших гипоксию на E14. Для этого проводили прижизненное мечение пролиферирующих клеток головного мозга эмбриона путем однократного введения 5'-этинил-2'-дезоксинуридина (EdU) самкам крыс линии Вистар на 14-й день беременности. В тот же день часть этих самок подвергали нормобарической гипоксии (3 ч при 7 % O₂). Визуализацию EdU-позитивных клеток в различных слоях теменной коры контрольных и перенесших пренатальную гипоксию крысят проводили с помощью Click-iT(r) EdU Alexa Fluor® 488 Imaging Kit (Invitrogen, США) на 5-е сут после рождения. Исследовали также клеточный состав и структуру ткани. У крыс, перенесших гипоксию на E14, наблюдалось снижение количества EdU-позитивных нейронов в сравнении с контрольными животными, что может свидетельствовать об изменении интенсивности пролиферации в эмбриогенезе. EdU-позитивные пирамидные нейроны у контрольных животных были локализованы преимущественно в V—VI слоях коры. У крыс, перенесших пренатальную гипоксию, отмечено увеличение количества EdU-позитивных клеток за пределами V—VI слоев, что указывает на нарушение миграции нейробластов. Морфометрический анализ нервной ткани показал, что на 10—20-е сут постнатального онтогенеза крыс, перенесших гипоксию, происходит снижение количества пирамидных нейронов II—III и V слоев новой коры, при этом число непиримидных нейронов остается неизменным. Таким образом, причиной изменений клеточного состава ткани новой коры в постнатальном онтогенезе животных, перенесших пренатальную гипоксию, может являться нарушение процессов пролиферации и миграции нейробластов в кортикальной пластинке в период эмбриогенеза.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-01156) и программы президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине».

ИЗМЕНЕНИЕ ОРГАНИЗАЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТОК ПРИ

ДЕЙСТВИИ РАЗНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ. © *Е. А. Вахромова, И. В. Воронкина, К. М. Кирпичникова, И. А. Гамалей.* Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, vakhromova.cath@gmail.com.

Состав и пространственная организация клеточного микроокружения во многом определяют функциональные свойства клеток и взаимодействия между ними. Реорганизация компонентов внеклеточного матрикса может нарушать процессы распознавания злокачественных клеток иммунокомпетентными клетками или изменять чувствительность клеток к бактериальной инвазии. С помощью иммунофлуоресценции и конфокальной микроскопии мы установили, что обработка мышинных трансформированных фибробластов линии 3T3-SV40 разными антиоксидантами по-разному меняет уровень коллагена I типа, секретируемого на клеточную поверхность. Исследовали длительное (24 ч) и кратковременное (4 ч) действие N-ацетилцистеина (NAC) в концентрациях 5 и 10 мМ, а также альфа-липоевой кислоты (ALA) в концентрации 1.25 мМ. Выяснили, что уже через 4 ч после введения NAC в среду продукция коллагена (о которой судили по интенсивности флуоресценции меченых антител к коллагену) усиливается на 30 % (относительно контроля), но через 24 ч уровень коллагена в значительной степени падает и оказывается ниже контрольного значения примерно на 20 %. ALA за 4 ч после начала обработки клеток либо вообще не изменяла, либо незначительно снижала количество коллагена на поверхности клеток. Спустя 1 сут после введения антиоксиданта в среду продукция коллагена значительно усиливалась. Удаление антиоксидантов NAC или ALA сменой среды приводило к постепенному восстановлению исходного уровня продукции коллагена, при этом в случае с действием NAC 24 ч оказывается недостаточно для полного возвращения к контрольному состоянию. Кроме того, мы показали, что и NAC, и ALA изменяют активность ряда матриксных металлопротеаз (ММП) — ММП-1, ММП-2 и ММП-9. Поэтому изменение количества коллагена на клеточной поверхности при действии NAC или ALA может быть связано, в частности, с изменением активности этих ММП. Следовательно, можно заключить, что антиоксиданты NAC и ALA способны вмешиваться в структуру внеклеточного матрикса клеток 3T3-SV40 и таким образом изменять поверхностные свойства этих клеток.

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

ДЕПОЗАВИСИМЫЙ ВХОД КАЛЬЦИЯ В КЛЕТКИ НЕЙРОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА SK-N-SH, ЯВЛЯЮЩИЕСЯ МОДЕЛЬЮ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА. © *В. А. Вигонт, О. А. Зимица, Л. Н. Глушанкова, Е. В. Казначеева.* Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, vvi-gand@gmail.com.

Повышение концентрации ионов кальция в цитозоле является одним из основных способов передачи сигналов от рецепторов плазматической мембраны к внутриклеточным системам. Такое повышение концентрации может достигаться как за счет выброса кальция из внутриклеточного

точного депо, так и за счет входа кальция через каналы плазматической мембраны. Одним из типов каналов, осуществляющих вход кальция из внеклеточной среды, являются депо-зависимые каналы. Для них эти два процесса связаны: опустошение депо вызывает вход кальция через депоуправляемые кальциевые каналы.

Болезнь Хантингтона является аутосомно-доминантным нейродегенеративным заболеванием, при котором поражаются преимущественно нейроны стриатума. Данное заболевание связано с мутацией в гене белка хантингтина, следствием которой является увеличение длины полиглутаминового тракта в N-концевой области хантингтина. В норме длина этого тракта не превышает 35 глутаминовых остатков, в то время как у больных длина тракта может достигать 36—100 остатков глутамина и более. В последнее время появляются данные, указывающие на взаимосвязь между болезнью Хантингтона и нарушениями в кальциевой сигнализации.

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

Методом локальной фиксации потенциала (patch-clamp) исследовался эффект аппликации тапсигаргина на развитие кальциевого входа в клетках SK-N-SH. Поскольку считается, что аппликация тапсигаргина ведет к пассивному опустошению депо и не влияет на другие клеточные сигнальные пути, зарегистрированный ток можно приписать работе депоуправляемых каналов.

Было показано, что в клетках 138Q, экспрессирующих мутантный хантингтин, депозависимый вход кальция существенно (в 4—5 раз) выше, чем в интактных клетках SK-N-SH и клетках 15Q.

Было исследовано влияние на этот вход производных киназолина — EVP-компаундов. Добавление активного EVP4593 в концентрации 300 нМ приводило к угнетению депозависимого входа кальция и в интактных клетках, и в клетках 15Q и 138Q, в то время как неактивный EVP14808 не оказывал на кальциевый вход какого-либо эффекта.

Дальнейшие исследования с использованием метода РНК-интерференции показали, что депозависимый вход кальция в клетках 138Q в основном опосредован каналами, имеющими в своем составе субъединицу TRPC1. Также показано, что соединение EVP4593 способно подавлять работу каналов, включающих в себя TRPC1 как одну из субъединиц, но не гомомерных каналов, состоящих исключительно из TRPC1.

Работа выполнена при финансовой поддержке госконтрактов 14.740.11.0924 и П332, Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 10-04-00956, 10-04-01002 и 11-04-12047), гранта президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-3796.2010.4) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» — грант фонда Дмитрия Зимица «Династия».

ОТ СТРУКТУРНОЙ ЭВОЛЮЦИИ К ЭВОЛЮЦИИ ФУНКЦИЙ БЕЛКОВ. © *Е. Ю. Галимова, В. П. Иванова.* Северо-Западный институт печати С.-Петербургского госу-

дарственного университета технологии и дизайна и Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, valet@iephb.ru.

Эволюцию белковых молекул условно можно разделить на структурную и функциональную. На первом этапе эволюционирования белков происходил отбор аминокислот, определивших формирование вторичной структуры белковой молекулы как базисной для структуризации полипептидной цепи. По-видимому, наиболее древней формой вторичной структуры являются β -складчатые слои, поскольку они могут образовываться как внутри одной полипептидной цепи за счет β -поворотов, так и между несколькими полипептидными цепями. При этом на стабилизацию β -структур особенности строения бокового радикала аминокислот практически не оказывают влияния. Что касается другого типа вторичной структуры белка — α -спирали, то в этом случае наблюдается иная картина. В настоящее время известны группы аминокислот, способствующих или препятствующих (замедляющих) формированию α -спирали. Именно отбор аминокислот с подобными характеристиками обеспечил формирование как регулярных, так и нерегулярных участков при самопроизвольном сворачивании полипептидной цепи. Сочетание способности полипептидной цепи к спирализации и формированию β -складчатых структур позволило белковым молекулам сворачиваться в меньшем пространстве по сравнению с полимерными молекулами с нерегулярной пространственной структурой, имеющей форму нерегулярного клубка. Помимо достижения термодинамически устойчивой конфигурации компактная укладка полипептидной цепи в пространстве обеспечивает сближение пептидных групп на расстояния, достаточные для формирования слабых и неспецифических взаимодействий (водородных связей), которые в силу их многократного повторения прочно удерживают, а значит, сохраняют приобретенную конформацию полипептидной цепи. Не менее важна роль аминокислот, точнее их боковых радикалов, в распределении гидрофильных и гидрофобных участков в полипептидных цепях при их сворачивании в пространстве. Подобное распределение усиливало или ослабляло гидрофильность белковых молекул в целом. Как известно, гидрофильность соединений — качество, определявшее весь путь биохимической эволюции на нашей планете. Этот этап эволюции белковых соединений завершается формированием в полипептидной цепи структурных доменов, которые в большинстве случаев представляют собой автономно сворачиваемые в пространстве единицы, фиксируемые не только слабыми взаимодействиями, но и ковалентными (дисульфидными) связями. Подобные домены являлись своеобразными строительными блоками, которые в ходе эволюционного процесса или многократно использовались для построения различных белков, или комбинировались с другими доменами. Сворачивание полипептидной цепи в трехмерную структуру представляет собой одно из звеньев в информационном потоке от гена к биологической функции. Второй этап, заключающийся в закреплении функций белков, является наиболее сложным и малоизученным в силу невозможности экспериментальным путем создать соответствующий модельный ряд. В основном мы можем строить гипотетический ряд переходных форм в ряду белковых соединений на основе существующих в настоящее время белковых молекул и их объединений (комплексов). Важным этапом для становления и развития функцио-

нальных модулей (определяемых как дискретные единицы, чьи функции отделимы от функций других модулей) явилось появление белковых комплексов. Интересно отметить, что большинство внеклеточных белков мономерно, в то время как большинство внутриклеточных белков олигомерно. Возможно, переход от мономерной к олигомерной форме белков обеспечил прогрессивное развитие клеточных систем и клетки в целом. К основным преимуществам олигомерных белков относятся следующие. Во-первых, отношение поверхности молекулы к ее объему у олигомеров меньше, чем у мономеров, поэтому олигомеры связывают меньше молекул воды и вносят меньший вклад в изменение вязкости цитоплазмы, что очень важно для протекания биохимических реакций. Во-вторых, наличие нескольких субъединиц в молекуле белка обеспечивает кооперативность их взаимодействия. Это приводит к усилению эффективности взаимодействия и ускорению проведения сигнала. Наконец, олигомерные соединения лучше приспособлены к молекулярной эволюции и более чувствительны к изменениям внешней среды. Дальнейшая эволюция функциональных модулей шла в направлении их укрупнения и специализации. К таким высокоупорядоченным белковым объединениям можно отнести различные сигнальные и метаболические пути, осуществляющие интегративную функцию в живой системе. Таким образом, любую биологическую функцию можно определить не как функцию отдельного белка, а как свойство функциональных модулей, состоящих из множества макромолекул, взаимодействующих с данным белком, т. е. функциональный модуль можно рассматривать как специфическую систему, подверженную эволюционному отбору.

МОДУЛИРОВАНИЕ ОТВЕТА ОНКОГЕНТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТОК НА ДЕЙСТВИЕ ДНК-ПОВРЕЖДАЮЩИХ АГЕНТОВ ИНГИБИТОРАМИ ДЕАЦЕТИЛАЗ ГИСТОНОВ. © О. О. Гнедина, Е. А. Филиппова, М. В. Абрамова, С. Б. Светликова, В. А. Поспелов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, mav_2004@mail.ru.

Ингибиторы деацетилаз гистонов (HDACi) подавляют рост опухолевых клеток, вызывая остановку деления, преждевременное старение или апоптоз. Однако пока не совсем ясно, какие сигнальные пути помимо ацетилирования гистонов и негистоновых белков вовлечены в HDAC ингибиторзависимую индукцию блока клеточного цикла и подавление пролиферации опухолевых клеток. Поэтому актуальной фундаментальной проблемой является изучение сигнальных путей (помимо непосредственного ацетилирования белков), которые опосредуют антипролиферативный эффект ингибиторов HDAC на трансформированные клетки. Последние данные свидетельствуют о том, что HDACi могут влиять на ответ клетки на генотоксические воздействия, тем самым повышая чувствительность клетки к действию ДНК-повреждающих агентов. Весьма перспективным представляется комбинированное сочетание ингибиторов HDAC и различных ДНК-повреждающих агентов для более эффективного подавления развития опухолей человека или индукции в них апоптоза.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что обработка онкогенотрансформированных фибробластов E1A+Ras ингибитором HDACi бутиратом натрия (NaB) приводит к

формированию фокусов фосфорилированного гистона H2AX (γ H2AX), которые, формируясь к 24 ч, персистируют не менее 72 ч. Мы исследовали характер модулирования бутиратом натрия активности киназ, способных фосфорилировать гистон H2AX. Мы проводили *in vitro* фосфорилирование бактериально экспрессированного субстрата GST-H2AX киназами, соосажденными с рекомбинантным белком GST-H2AX. После этого уровень фосфорилированности субстрата детектировали иммуноблотингом с антителами к фосфорилированной форме гистона H2AX. Нами были получены новые данные о том, что активность киназ, ассоциированных с гистоном H2AX, снижается с течением времени действия NaB.

Нами было показано, что индуцированное ингибиторами HDAC накопление γ H2AX повышает чувствительность клеток к действию ДНК-повреждающего агента, ингибитора топоизомеразы адриамицина. Методом иммуноблотинга мы показали, что NaB продлевает время существования фокусов γ H2AX, индуцированных адриамицином. Однако существенное значение имеет очередность действия агентов. Так, предварительная обработка трансформированных клеток бутиратом натрия в течение 24 ч приводит к их накоплению в фазе G₁ клеточного цикла и обеднению пула клеток в фазе S. Как следствие, в предобработанных NaB клетках эффективный противораковый агент адриамицин, активность которого реализуется на S-фазных клетках, не способен усилить фосфорилирование гистона H2AX и вызывать двухнитевые разрывы ДНК, определяемые методом электрофоретического разделения ДНК одиночных клеток в нейтральных условиях (нейтральный метод комет). Анализируя активность каспаз с использованием специфического колориметрического субстрата, мы показали также, что предобработка NaB подавляет способность адриамицина активировать проапоптотическую программу клеточной гибели.

АКТИВНОСТЬ АНТИМИКОТИКА АМФОТЕРИЦИНА В ЛИПИДНЫХ БИСЛОЯХ, СОДЕРЖАЩИХ ДИПОЛЬНЫЕ МОДИФИКАТОРЫ. © С. С. Ефимова, О. С. Остроумова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ssefimova@mail.ru.

Полиеновый антимикотик амфотерицин В (АмВ) является одним из наиболее эффективных противогрибковых агентов. АмВ связывается со стеринами, находящимися в мембранах клеток-мишеней, и формирует ионные каналы (Andreoli, 1974; Borisova et al., 1986). В результате нарушается водно-электролитный баланс клетки, и она гибнет. Известно, что на мембранную активность различных каналобразующих соединений влияет дипольный потенциал мембраны (ϕ_d) (Rokitskaya et al., 1997; Luchian, Mereuta, 2006; Ostroumova et al., 2010) — скачок потенциала на границе раздела фаз бислоя—раствор, возникающий в результате взаимной ориентации диполей мембранных липидов и воды (Franklin, Cafiso, 1993). Величину ϕ_d можно варьировать с помощью дипольных модификаторов: растительных фенолов, флавоноидов (уменьшающих ϕ_d) и стироловых красителей серии RH (увеличивающих ϕ_d). Поскольку поражающее действие АмВ на клетки связано с образованием в их мембранах каналов, необходимо изучение влияния дипольных модификаторов (флоретина, флоридзина, генистеина, кверцетина, биоханина и RH 421) как на проводимость одиночных каналов, так и

на стационарное число открытых в мембране АмВ-каналов (N_{op}).

Бислойные липидные мембраны формировали по методу Монтала и Мюллера (Montal, Muller, 1972) из смеси дифитаноилфосфохолина (ФХ) и холестерина (ФХ : Хол = 67 : 33 М%) или ФХ : эргостерина (ФХ : Эрг = 67 : 33 М%) в 2 М КСl (рН 7.0).

Результаты наших измерений говорят об изменении проводимости одиночных АмВ-каналов в ФХ : Хол- и ФХ : Эрг-бислоях в присутствии указанных выше дипольных модификаторов (Ostroumova et al., 2011). Эти изменения в основном определяются дипольным потенциалом мембраны. Исследование влияния диполь-модифицирующих агентов на N_{op} показало, что добавка 20 мкМ флоретина вызывает существенное увеличение N_{op} в 5—76 раз в ФХ : Хол-бислоях ($\Delta\phi_d = -75 \pm 10$ мВ) и незначительный рост в 1.7 ± 0.4 раза в ФХ : Эрг-мембранах ($\Delta\phi_d = -150 \pm 5$ мВ), а присутствие 20 мкМ кверцетина увеличивает N_{op} в 2.1 ± 0.5 раза в ФХ : Хол-мембранах ($\Delta\phi_d = -100 \pm 10$ мВ) и уменьшает N_{op} в 2 ± 0.6 раза в ФХ : Эрг-бислоях ($\Delta\phi_d = -120 \pm 10$ мВ). При этом эффекта других флавоноидов (флоридзина, генистеина или биоханина при концентрации 20 мкМ), в меньшей степени изменяющих ϕ_d , чем флоретин и кверцетин, на N_{op} в Хол- и Эрг-содержащих мембранах не наблюдалось. Введение 5 мкМ RH 421 в растворы, омывающие ФХ : Хол-бислоя ($\Delta\phi_d > 35$ мВ), уменьшает N_{op} в 1.5 ± 0.1 раза, а добавка этого модификатора в растворы, омывающие ФХ : Эрг-мембраны ($\Delta\phi_d 40$ мВ), увеличивает N_{op} в 2—16 раз. Полученные данные указывают на то, что эффекты дипольных модификаторов на N_{op} преимущественно обусловлены их специфическим взаимодействием с АмВ/стериновыми комплексами и в меньшей степени — влиянием дипольного потенциала мембраны.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 09-04-00883), программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и грантов президента РФ (НШ-3796.2010.4 и МК-1813.2012.4).

ИЗМЕНЕНИЯ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ И АКТИВНОСТИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕАСОМ ПРИ ИНДУКЦИИ АПОПТОЗА. © Ю. Я. Зайкова, В. А. Куличкова, А. С. Цимоха. Институт цитологии РАН, vat-julia@yandex.ru.

Протеасома — ключевой элемент в убиквитин-протеасомной системе деградации белка в клетке. Осуществляя протеолиз и процессинг большинства регуляторных белков, а также неправильно собранных и поврежденных белков, протеасомы участвуют в большинстве клеточных процессов, например в регуляции транскрипции, репарации ДНК, продвижении клетки по циклу, иммунном ответе и апоптозе. Протеасомы были обнаружены как в цитоплазме, так и в ядре клеток, кроме того, в последнее время появились данные о присутствии их во внеклеточном пространстве. Известно, что внеклеточные протеасомы по строению схожи с внутриклеточными, однако их функции еще недостаточно исследованы. В данной работе исследуются изменения посттрансляционных модификаций протеасом, очищенных из среды, кондиционированной клетками проэритролейкемии линии K562, при индукции апоптоза, а также изменения пептидазных ак-

тивностей исследуемого белкового комплекса. Для изучения влияния индукции апоптоза на активности и посттрансляционные модификации внеклеточных 26S-протеасом клетки K562 инкубировали в присутствии доксорубина в течение 24 ч. После инкубации белковые комплексы очищали осаждением сульфатом аммония с последующим разделением в градиенте плотности сахарозы и очисткой при помощи ионообменной хроматографии. Степень чистоты полученных белков оценивали методом одномерного электрофореза, сопряженного с иммуноанализом. Для оценки изменения активности внеклеточных протеасом при индукции апоптоза были проведены эксперименты с флуорогенными пептидными субстратами для измерения химотрипсин-, трипсин- и каспаза-подобных активностей протеасом. Как оказалось, действие доксорубина на клетки вызывает снижение трипсин- и каспаза-подобных активностей внеклеточных протеасом по сравнению с таковыми из контрольной среды. В то же время действие доксорубина практически не влияет на химотрипсин-подобную активность. Следует отметить, что внеклеточные протеасомы отличаются также от внутриклеточных по химотрипсин-, трипсин- и каспаза-подобным активностям. Внеклеточные протеасомы активнее по химотрипсин- и каспаза-подобным типам протеолитической активности, а внутриклеточные — по трипсин-подобному типу. Принято считать, что изменение активности протеасом зависит от посттрансляционных модификаций субъединиц, ассоциированных с этой активностью. Для исследования посттрансляционных модификаций субъединиц протеасом проводили двумерное электрофоретическое разделение белков в денатурирующих условиях с последующим Вестерн-блот-анализом с применением специфических антител против отдельных субъединиц протеасом. Мы показали, что паттерн посттрансляционных модификаций внеклеточных протеасом более разнообразен, чем таковой у внутриклеточных комплексов из клеток линии K562. Кроме того, внеклеточные протеасомы, очищенные из культуральной среды контрольных и индуцированных к апоптозу клеток, также различаются по своему составу. Полученные данные свидетельствуют о том, что при индукции апоптоза изменяются как специфика пептидазных активностей внеклеточных протеасом, так и посттрансляционные модификации субъединиц исследуемого комплекса, что свидетельствует об участии протеасом в апоптотическом процессе.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-01234), программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 гг. (ГК № 16.740.11.0366).

УЧАСТИЕ РЕЦЕПТОРА ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА В РЕГУЛЯЦИИ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ МИКРОТРУБОЧЕК В ХОДЕ ЭНДОЦИТОЗА. © М. В. Злобина, Ю. Ю. Стеблякко, Е. С. Корнилова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, aquimaria@gmail.com.

Микротрубочки (МТ) — динамичные полимеры, состоящие из димеров альфа- и бета-тубулина, участвуют в формировании веретена деления в митозе, в поддержа-

нии транспорта везикул и позиционировании органелл в интерфазных клетках. Давно известно, что МТ могут подвергаться посттрансляционным модификациям, в частности ацетилированию. Уровень ацетилирования МТ определяется балансом активностей конститутивно работающей ацетилтрансферазы и МТ-специфичной деацетилазы HDAC6, причем при деполимеризации МТ происходит деацетилирование тубулина. Таким образом, высокодинамичные МТ являются низкоацетилированными, тогда как стабильные, долгоживущие МТ ацетилированы сильнее, поэтому ацетилирование часто рассматривают как маркер пула стабильных МТ. До сих пор неизвестно, какие внутриклеточные процессы могут влиять на уровень ацетилирования МТ.

Исследуя механизмы реорганизации системы МТ в интерфазных клетках в ходе эндоцитоза рецептора эпидермального фактора роста (ЭФР), мы обнаружили, что стимуляция этого процесса вызывает волнообразное увеличение уровня ацетилирования МТ, достигающего максимума через 60—90 мин. При этом ранние, EEA1-позитивные эндосомы, активно перемещающиеся по МТ в околядерную область (ОЯО), ассоциированы с динамичными МТ, тогда как зрелые поздние укрупненные эндосомы в ОЯО локализованы на сильно искривленных высокоацетилированных МТ. Мы также показали, что стимуляция эндоцитоза рецептора ЭФР такими нативными лигандами, как ЭФР, направляющий рецептор на деградацию в лизосомы, и TGF- α , направляющий его на путь рециклирования, вызывает волнообразное увеличение ацетилирования МТ с максимумом через 60—90 мин, при этом эффект ЭФР выражен сильнее.

Поскольку рецептор при действии ЭФР дольше остается активированным, чем в случае TGF- α , мы предположили, что тирозинкиназная (ТК) активность рецептора может быть вовлечена в регуляцию ацетилирования МТ. Для проверки этого предположения клетки обрабатывали ингибитором ТК AG1478, подавляющим активность рецептора, но не препятствующим его эндоцитозу. Оказалось, что при инактивации рецептора уровень ацетилирования МТ после стимуляции эндоцитоза остается достаточно низким, однако на поздних стадиях он вновь повышается, причем максимум ацетилирования МТ в отсутствие активации рецептора смещается на более поздние сроки (90—120 мин) после запуска эндоцитоза.

Кроме того, в присутствии ингибитора протонной помпы бафиломицина А1, подавляющего закисление эндосом и тем самым препятствующего диссоциации лигандов и рецепторов, стимуляция эндоцитоза рецептора с помощью TGF- α вызывала увеличение степени ацетилирования МТ до уровня, сравнимого с действием ЭФР. Такой эффект наблюдался на ранних этапах эндоцитоза, однако позже, несмотря на то что рецептор оставался активированным, уровень ацетилирования МТ падал.

Таким образом, можно говорить о том, что сигналы, генерируемые рецептором ЭФР, непосредственно вовлечены в регуляцию ацетилирования МТ на ранних сроках эндоцитоза, тогда как на поздних этапах действует механизм регуляции, не зависящий от ТК-активности рецептора ЭФР. Механизмы рецептор-зависимой регуляции могут быть связаны с участием деацетилазы HDAC6, однако для подтверждения этого предположения необходимы дополнительные исследования.

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

ект 09-04-01215), программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и гранта президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-3273.2010.4).

ЯДЕРНЫЕ СТРУКТУРЫ ООЦИТОВ ЛАБОРАТОРНОГО НАСЕКОМОГО *TRIBOLIUM CASTANEUM*. © А. М. Куцелев, Ф. М. Баталова, Д. С. Боголюбов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, artem.kiselyov@gmail.com.

Булавоусый мучной хрущак *Tribolium castaneum* (Coleoptera—Polyphaga: Tenebrionidae) — вредитель продовольственных запасов и новый лабораторный вид насекомых. Это первый среди Coleoptera вид, геном которого полностью секвенирован как у наиболее характерного представителя Artropoda, не отличающегося (в отличие от, например, *Drosophila*) высоким уровнем эволюционной специализации. Однако в настоящее время практически отсутствуют работы, в которых исследовался бы проэмбриональный период развития этого нового модельного объекта, в частности морфодинамика ядерных структур в оогенезе. Мы представляем первые данные о структурно-функциональной организации ядер ооцитов *T. castaneum*. С помощью иммунофлуоресцентной (конфокальной) микроскопии нами впервые идентифицированы универсальные экстрахромосомные домены нуклеоплазмы ооцитов *T. castaneum* — кластеры интерхроматинных гранул и тельца Кахала — по присутствию в них маркерных белков SC35 или коилина. В отличие от ооцитов ряда других насекомых мы практически не обнаружили перекрытия сигналов к этим двум антигенам в ооцитах *T. castaneum*. В ходе изучения динамики оогенеза *T. castaneum* нами обнаружено, что на стадии диплотены хромосомы ооцита довольно рано объединяются в компактную кариосферу, однако значительной конденсации хроматина при этом не происходит. С помощью микроринъекций в ооциты бром-УТФ показано, что полного выключения генома ооцита из транскрипционных процессов не происходит даже в поздних вителлогенных ооцитах, хотя интенсивность включения предшественника невысока. Таким образом, установлена возможность сохранения некоторой транскрипционной активности ядрами поздних диплотенных ооцитов, завершающих рост, у насекомых с мероистическими яичниками в условиях формирования кариосферы. Процесс формирования кариосферы в ооцитах *T. castaneum* сопровождается формированием обширной экстрахромосомной капсулы. На основании морфологических особенностей кариосферы, структурных элементов ее капсулы, экстрахромосомных ядерных телец (доменов), степени развития фолликулов, морфологических особенностей фолликулярного эпителия и стадии вителлогенеза нами выделено 8 стадий, характеризующих период роста ооцитов *T. castaneum*. Мы неожиданно обнаружили, что материал капсулы кариосферы помимо структурных белков ядерного матрикса (F-актин, ламин В, ДНК-топоизомераза II), содержит «Sm-эпитоп» малых ядерных (мя) РНП и триметилгуанозиновый кэп, характеризующий 5'-конец молекул «зрелых» мяРНК сплайсинга. Эти данные должны послужить основой для дальнейшего расширения представлений о функциях капсулы кариосферы, которая может, по-видимому, не только играть структурную роль, но и выступать как возможный интегрирующий элемент для ядерных процессов, связанных в том числе с метаболизмом РНК.

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

СВИДЕТЕЛЬСТВА МУЛЬТИПОТЕНТНОГО СОСТОЯНИЯ КЛЕТОК ЗОНЫ РОСТА ПОЛИХЕТЫ *NEREIS VIRENS*. © В. В. Козин, Р. П. Костюченко. С.-Петербургский государственный университет, vitalik-spbcity@mail.ru.

Зона роста полихет, дающая начало всем постларвальным сегментам тела, является интереснейшей моделью для изучения вопросов клеточной пластичности, дифференцировки и самообновления. Чаще всего происхождение зоны роста связывают с линией не дифференцированных ранее в эмбриогенезе экто- и мезо-телобластов (Anderson, 1966, 1973; Shimizu, Nakamoto, 2001). Однако, по альтернативной гипотезе П. П. Иванова, зона роста полихет формируется при метаморфозе путем дедифференцировки клеток покровного эпителия, которые дают как эктодермальные, так и мезодермальные производные (Iwanoff, 1928). Метаморфоз является одним из ключевых событий в онтогенезе животных с непрямым развитием. Именно при переходе от личинки к ювенильной форме закладываются основные дефинитивные черты строения организма, создавая предпосылки для дальнейшего роста и развития. Кроме того, метаморфоз следует понимать и как смену генетической программы развития, сопровождающейся активацией новых генов и вовлечением новых морфогенезов, участвующих в перестройке всего тела. В большинстве случаев при метаморфозе кардинальным образом изменяются не только анатомия, физиология и образ жизни, но и тканевая организация животного. Часто при метаморфозе ведущую роль играют особые, характеризующиеся малодифференцированным (часто стволовым) состоянием клеточные популяции, из которых и будет построено постларвальное тело. У полихет все постларвальные сегменты образуются из предпигидиальной зоны роста, клеточный источник и организация которой до сих пор остаются загадкой. Для изучения этой интереснейшей проблемы нами был выбран современный подход анализа паттернов экспрессии консервативных генов, который позволяет установить особенности развития различных зачатков во времени и пространстве на молекулярном уровне. Рассматривая зону роста как уникальный регион, пролиферирующий новые ткани и органы сегментов тела, многообещающим нам представляется использовать генетические маркеры, экспрессирующиеся в мультипотентных стволовых и малодифференцированных клетках. Целью настоящей работы являлось изучение молекулярного статуса, особенностей организации и возможных механизмов функционирования зоны роста полихет. В ходе работы с помощью гибридизации *in situ* нами была описана динамика экспрессии консервативных маркеров стволового состояния клеток — гомологов генов *Vasa*, *PL10* и *Piwi* — при метаморфозе и в раннем постларвальном развитии полихеты *Nereis virens*. Было установлено, что гены *Nvi-vasa*, *Nvi-pl10*, *Nvi-piwiA* и *Nvi-piwiB* дифференциально экспрессируются в клетках разных зародышевых листков, вовлеченных в активные морфогенетические процессы развития *N. virens*. Экспрессия изучаемых генов в области зоны роста оформляется на стадии метатрохофоры изначально в поверхностных эпителиальных клетках, а у нектохет транс-

крипты гомологов *Vasa*, *PL10* и *Piwi* были обнаружены как в покровах пигидия, так и во вновь формирующейся постларвальной мезодерме. Полученные нами ранее данные о характеристиках клеточных циклов и экспрессии тканеспецифичных генов в совокупности с представленными результатами говорят в пользу формирования зоны роста *N. virens* как особой мультипотентной клеточной популяции именно в период метаморфоза. Эти результаты не подтверждают преемственности зоны роста и линии эмбриональных телобластов. В то же время вероятным представляется формирование мезодермальной части зоны роста из возможно выселяющихся на стадиях метатрохофоры и нектохеты покровных клеток пигидия, молекулярный профиль которых соответствует статусу мультипотентных клеток.

ВЛИЯНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА, ПОЛУЧЕННОГО РАЗНЫМИ МЕТОДАМИ, НА ПОДДЕРЖАНИЕ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В КУЛЬТУРЕ. © А. М. Кольцова, Л. В. Смагина, И. В. Воронкина, Г. Г. Полянская. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, koltsova.am@mail.ru.

Эмбриональные стволовые клетки человека (ЭСКч), полученные из внутренней клеточной массы бластоцисты (5—6-й день эмбрионального развития), представляют собой уникальные клеточные популяции, обладающие такими свойствами, как неограниченная пролиферация *in vitro* и плюрипотентность — способность дифференцироваться во все типы соматических клеток и в линию половых клеток.

Традиционно линии ЭСКч получают и поддерживают в культуре в присутствии слоя фидерных клеток (от англ. feed — кормить), которые являются источником растворимых факторов и белков внеклеточного матрикса (ВКМ). Культивирование ЭСКч в бесфидерной системе с использованием в качестве субстрата белков ВКМ позволило бы не только избежать проблемы контаминации, но и стандартизировать всю систему.

Наряду с работами, в которых в качестве субстрата применяют отдельные белки ВКМ, есть работы, посвященные культивированию ЭСКч на белках ВКМ, наработанных фидерными клетками и оставшимися на культуральной поверхности после снятия фидера. Очевидно, что от конкретных условий культивирования фидерных клеток и от способа их снятия зависит качество получаемого субстрата.

Целью данной работы было выявить, есть ли разница между ВКМ, получаемыми разными способами, и если да, то оказывают ли эти различия влияние на ростовые характеристики ЭСКч.

В работе анализировали ВКМ от линии MSC-SC5 (мезенхимные фибробластоподобные клетки, полученные из линии ЭСКч-SC-5), полученный тремя способами: 1) снятие монослоя фидерных клеток с культуральной поверхности без использования какой-либо обработки (Var. 1); 2) снятие монослоя фидерных клеток с культуральной поверхности после его предварительной заморозки при -70°C (Var. 2); 3) снятие монослоя митотически инaktivированных фидерных клеток с культуральной поверхности без использования какой-либо обработки (Var. 3).

Иммунофлуоресцентный анализ при помощи антител против фибронектина, коллагена I типа и интерстициальных коллагенов I—III типов с последующей оценкой

уровня флуоресценции при помощи программы ImagG показал достоверные различия в количестве этих белков в субстратах, полученных разными способами ($P < 0.01$). Уровень флуоресценции фибронектина в Var. 1 составил $26\,082 \pm 1660$ у. е., для Var. 2. — 8968 ± 501 у. е. и для Var. 3 — 5345 ± 210 у. е. Уровень флуоресценции коллагена I типа составил $133\,348 \pm 2879$ у. е., $170\,933 \pm 5273$ у. е. и $110\,888 \pm 2947$ у. е. соответственно. Для интерстициальных коллагенов уровень флуоресценции составил $24\,560 \pm 1295$ у. е. для Var. 1, 3705 ± 363 у. е. для Var. 2 и $16\,422 \pm 1794$ у. е. для Var. 3. Для фибронектина и интерстициальных коллагенов наибольший уровень флуоресценции наблюдался в Var.1, для коллагена I типа — в Var. 2.

Методом электрофореза также были выявлены различия в составе получаемого разными методами ВКМ.

Влияние ВКМ на рост линии ЭСКч -SC-5 определяли путем вычисления времени удвоения клеточной популяции. Расчеты показали, что при культивировании данной линии в Var. 1 ВКМ время удвоения составило 22.8 ± 0.6 ч, на Var. 2 — 23.6 ± 0.2 ч и в Var.3 — 23.0 ± 0.5 ч.

Время удвоения клеточной популяции линии ЭСКч-SC-5 при культивировании на субстратах, полученных разными методами, не имеет достоверных различий. На основании этого можно сделать вывод о том, что различия в качестве и составе ВКМ, получаемого предлагаемыми методами, не влияют на рост самих ЭСКч. Таким образом, при дальнейшем поиске белков ВКМ, играющих ключевую роль в поддержании ЭСКч в культуре, стоит обратить внимание не на различия среди представленных субстратов, а на их общие черты.

ТАНДЕМНЫЕ ДНК-ПОВТОРЫ В ГЕНОМАХ ПРИМАТОВ. © А. С. Комиссаров, О. И. Подгорная. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ad3002@gmail.com.

Тандемные повторы формируют значительную часть генома приматов. В основном они концентрируются в центромерных и перицентромерных регионах. Исторически тандемные повторы относили к так называемой мусорной ДНК, но сейчас стало понятно, что их тандемная организация обеспечивает уникальные структурные и функциональные характеристики. Состав тандемных повторов хорошо изучен в геноме человека, который содержит тандемные повторы с разной длиной мономеров и разными типами организации мономеров в поля тандемных повторов — от коротких микросателлитов с мономером в несколько нуклеотидных пар до мегасателлитов с длиной мономера, превосходящей несколько тысяч нуклеотидных пар. У человека центромерный регион всех хромосом содержит альфа-сателлитную ДНК — самое крупное семейство тандемных повторов в человеческом геноме. Поля альфа-сателлита окружены полями «классических» сателлитов, таких как HS1—4 (Human Satellite 1—4). У других приматов более или менее изучена только альфа-сателлитная ДНК. Целью представленной работы являются анализ больших тандемных повторов в геномах приматов и сравнение с большими тандемными повторами из генома человека.

Для анализа больших тандемных повторов на уровне генома мы выбрали 10 геномов следующих видов: западная горилла (*Gorilla gorilla*), макака-резус (*Macaca mulatta*), обыкновенный шимпанзе (*Pan troglodytes*), суматранский орангутан (*Pongo abelii*), толстохвостый галаго (*Oto-*

lemur garnettii), филиппинский долгопят (*Tarsius syrichta*), обыкновенная игрунка (*Callithrix jacchus*), серый мышный лемур (*Microcebus murinus*), белощекий гиббон (*Nomascus leucogenys*) и человек (*Homo sapiens*).

Большие тандемные повторы, найденные в каждом геноме приматов, мы разделили на суперсемейства и семейства согласно ранее предложенной классификации. Среди проанализированных геномов приматов мы нашли несколько вариантов организации больших тандемных повторов, различающихся как по количеству, так и по составу семейств. Наиболее сложно на геномном уровне устроены большие тандемные повторы в геномах человека, шимпанзе и орангутана, особенно по сравнению с мокроносными обезьянами. Мы обнаружили, что в геноме гориллы, несмотря на ее близость к человеку, самым большим по количеству найденных полей тандемным повтором является не альфа-сателлитная ДНК, а большой тандемный повтор, основанный на мономере 32 н. п. При этом в геноме гориллы классический альфа-сателлит тоже присутствует, но находится на пятом месте по количеству найденных мономеров. В геномах галаго, долгопята и лемура мы также обнаружили замену альфа-сателлита на другой большой тандемный повтор, в то время как в геномах человека, макаки, шимпанзе, орангутана, игрунки и гиббона наиболее представленным большим тандемным повтором является альфа-сателлитная ДНК.

На примере приматов мы показали, что при анализе тандемных повторов хорошо прочитанных геномов высших эукариот можно выявить общие закономерности, несмотря на видоспецифичность больших тандемных повторов. Мы предполагаем, что сходные классы со сходными характеристиками необходимы для нормального эукариотического генома.

ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЖЕЛТОЧНОГО СИНЦИТИАЛЬНОГО СЛОЯ *DANIO RERIO* (TELEOSTEI). © Е. А. Кондакова. С.-Петербургский государственный университет, 23eak@mail.ru.

Желточный синцитиальный слой (ЖСС), или перибласт зародышей и личинок костистых рыб, — это провизорная структура, формирующаяся у *Danio rerio* на стадии средней бластулы из краевых blastомеров и выполняющая морфогенетическую и трофическую функции (утилизация желтка), а также являющаяся местом синтеза веществ, вовлеченных в реакции врожденного иммунитета. Хотя *D. rerio* широко используется как модельный объект биологии развития, данные о морфологии ЖСС фрагментарны, а о механизме гибели — отсутствуют. Целью настоящей работы было прослеживание динамики некоторых морфологических характеристик ЖСС со стадии куполообразной бластулы до начала периода фарингулы, а также в конце его существования в личиночном периоде. В работе применялись гистологические методики — окраска гематоксилином Караччи с эритрозином и железным гематоксилином по Гейденгайну. Уже на стадии куполообразной бластулы ядра ЖСС имеют разный размер, причем встречаются очень крупные. До стадии 50 % эпиболии включительно большинство ядер округлые или эллиптические. Ядра неправильной формы редки, но более поздних стадиях их количество возрастает. На стадии 75 % эпиболии представлено уже большее количество лопастных, в том числе «фестончатых», ядер. При закрытии желточной пробки между смыкающимися

краями blastодермы и в целом каудально слой цитоплазмы ЖСС велик и содержит большое количество полиморфных ядер. При исследовании названными методами ядрышки у зародышей *D. rerio* начинают выявляться в ядрах клеток дефинитивных структур и ядрах ЖСС не ранее стадии хвостовой почки. Со стадии хвостовой почки характеристики слоя цитоплазмы ЖСС следующие: с дорсальной стороны ЖСС утолщается в каудальном направлении, особенно под хвостовой почкой, где наблюдается большое количество крупных ядер, ранее составлявших «blastопоральное кольцо», а в остальных местах — тонкие. Ядра в них преимущественно одиночные и крупные. Кроме того, на стадиях 3—5 сомитов ЖСС утолщен под сомитами. Под головой толщина ЖСС минимальна. В дальнейшем происходит последовательное истончение дорсальной части ЖСС. Характеристики ЖСС, сохраняющиеся до начала личиночного периода включительно (описаны в нашей предыдущей работе), окончательно устанавливаются при образовании вытянутой части желточного мешка на стадии 14 сомитов. Наибольшую толщину ЖСС имеет вентрально в задней области шаровидной и вытянутой части желточного мешка, наименьшую — спереди и дорсально (особенно дорсо-медиально). В остатке ЖСС личинки, уже лишенной желтка и фагоцитируемом крупными клетками с единственной объемистой фаголизосомой, у одних особей ядра ЖСС пикнотические, у других — непикнотические. В последнем случае, вероятно, фагоцитоз осуществляется на более ранней стадии программированной клеточной гибели. Таким образом, нами получены сведения о динамике некоторых морфологических характеристик ЖСС *D. rerio* на последовательных стадиях развития, дополняющие данные других авторов о функциях ЖСС и миграции его ядер. Природа и функциональная значимость описанных изменений ЖСС со стадии хвостовой почки и механизм клеточной смерти, за счет которого деградирует ЖСС, требуют дальнейшего изучения.

МЕХАНИЗМЫ ОБРАТИМОЙ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ ДЕПРЕССИИ В ГЕПАТОЦИТАХ МИНОГИ РЕЧНОЙ (*LAMPERTA FLUVIATILIS*) В ПЕРИОД ПРЕДНЕРЕСТОВОЙ МИГРАЦИИ. © С. А. Коновалова, М. В. Савина. Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, svetakonovava@gmail.com.

Метаболическая депрессия — резкое снижение энергетического метаболизма — сопровождается множеством заболеваний человека (например, врожденные митохондриальные заболевания, нейродегенеративные заболевания, сепсис). Клинические случаи метаболической депрессии необратимы и часто имеют летальный исход. В то же время обратимая метаболическая депрессия является неотъемлемой частью жизненного цикла многих животных. Минога речная в период преднерестовой миграции не питается, в результате в ее печени развивается метаболическая депрессия, но она обратима. Весной, непосредственно перед нерестом, в гепатоцитах активируются липолиз липидных капель и синтез вителлогенина — белка, необходимого для созревания икринок, и энергетические характеристики гепатоцитов возвращаются к нормальным значениям, но на короткое время: после нереста миноги погибают. Цель настоящей работы — изучить механизмы, лежащие в основе развития и регуляции обра-

тимой метаболической депрессии, на примере гепатоцитов миноги. Для определения концентрации адениновых нуклеотидов в кусочках печени и в гепатоцитах миноги использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии и люциферин-люциферазный метод. Митохондриальный мембранный потенциал в изолированных гепатоцитах оценивали с помощью потенциалзависимых флуоресцентных красителей TMRM, DiOC₆, JC-1 и MTG на проточном цитометре и на конфокальном микроскопе. Внутриклеточный pH гепатоцитов измеряли с использованием pH-чувствительного флуоресцентного красителя SNARF-1 AM. Для определения внутриклеточной концентрации кальция использовали флуоресцентный зонд FURA-2 AM. Обнаружено, что в зимний период метаболической депрессии концентрация АТФ, энергетический заряд Аткинсона, а также митохондриальный мембранный потенциал в гепатоцитах миноги снижаются. При этом внутриклеточная концентрация кальция умеренно возрастает (на 50—80 %), а внутриклеточные кальциевые депо опустошены. Эта ситуация создает условия для регуляции активности каналов плазматической мембраны путем обратимого фосфорилирования белков. Кроме того, в период метаболической депрессии в гепатоцитах миноги наблюдается стойкое снижение внутриклеточного pH, что может являться одним из механизмов, защищающих клетки от гибели в период метаболической депрессии. Защита клетки состоит в том, что внутриклеточный кислотозамедляет аутолитические процессы деградации (например, протеолиз или гидролиз фосфолипидов), инициируемые при истощении АТФ. Весной концентрации адениновых нуклеотидов и митохондриальный мембранный потенциал возвращаются к осенним значениям, что сопровождается снижением цитозольной концентрации кальция и увеличением внутриклеточного pH.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И ТРАНСКРИПЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ САТЕЛЛИТНОЙ ДНК В КЛЕТКАХ ЛИНИИ MDCC-MSB1 ДОМАШНЕЙ КУРИЦЫ. © А. В. Красикова, А. В. Маслова, Е. В. Василевская, А. М. Злотина. С.-Петербургский государственный университет, alla.krasikova@gmail.com.

Формирование конститутивного гетерохроматина в ходе дифференцировки клеток связано с активностью сателлитных повторов ДНК, которые образуют протяженные однородные массивы в теломерных, центромерных и интерстициальных районах хромосом. Пластичность в уровне компактизации сателлитной ДНК приводит к разнообразию в трехмерной организации генома, которая оказывает влияние на транскрипционную активность генов. Конкретные механизмы участия центромерных и теломерных районов хромосом в поддержании упорядоченной радиальной организации генома, формировании хромоцентров и регуляции экспрессии генов во многом остаются не раскрытыми. Целью настоящей работы было проанализировать пространственную организацию и транскрипционную активность tandemных повторов ДНК в клетках лимфобластомы линии MDCC-MSB1 домашней курицы. К преимуществам этой модели относится кариотип курицы, который состоит из различающихся по размеру и плотности генов групп хромосом. В геноме курицы в настоящий момент охарактеризованы теломерный, субтеломерные (PO41 и Z-макросателлит), центромерные, W-специфичные и интерстициальные tandemные по-

вторы ДНК. Сателлитные повторы Cen1, Cen2, Cen3, Cen4, Cen7, Cen8 и Cen11, а также не содержащие tandemных повторов CENP-A-связывающие фрагменты ДНК CenZ, Cen4 и Cen27 локализируются в центромерных районах соответствующих хромосом и на стадии ламповых щеток занимают два крупных хромомера, окружающие центромерную гранулу. Анализ локализации перечисленных повторов в клетках MDCC-MSB1 проводили с помощью метода 3D-FISH. Результаты анализировали методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии с последующим построением изоповерхностей по контуру флуоресцентного сигнала с использованием программ Imaris и ImageJ.

В результате мы обнаружили, что в интерфазных ядрах клеток MDCC-MSB1 центромеры большинства макрохромосом локализируются на периферии ядра. Повтор CNM, характерный для центромерных районов микрохромосом, был найден в DAPI-позитивных хромоцентрах, располагающихся преимущественно в центральной части ядра. При этом оказалось, что хромоцентры очень редко содержат одновременно центромерные последовательности ДНК макро- и микрохромосом, территории которых находятся в разных радиальных зонах ядра. Таким образом, обедненные генами макрохромосомы закорены в периферийном слое гетерохроматина вблизи ядерной оболочки, а обогащенные генами микрохромосомы локализируются в центральной части ядра, будучи закореными в хромоцентры. С помощью метода ДНК/РНК *in situ*-гибридизации мы также впервые обнаружили транскрипцию tandemных повторов ДНК в соматических клетках курицы. Мы показали, что субтеломерный tandemный повтор PO41 транскрибируется в клетках лимфобластомы MDCC-MSB1 с C-богатой нити. В интерфазных ядрах транскрипты повтора PO41 формируют один-два крупных домена в нуклеоплазме, а на стадии анафазы/ранней телофазы кластеризуются около терминальных районов хромосом. Полученные данные свидетельствуют о том, что синтезируемые в интерфазе транскрипты tandemного повтора PO41 могут участвовать в формировании гетерохроматина после анафазы митоза.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА РЕГУЛЯЦИИ ГЕНА OCT4. © В. А. Красноторова, И. Б. Назаров, А. Н. Томиллин. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, vkrasnatorova@mail.ru.

В последние несколько десятилетий проявляется все больший интерес к эмбриональным стволовым (ЭС) клеткам. Это связано с тем, что ЭС-клетки имеют большую перспективу применения в клинической практике.

Важнейшим фактором поддержания плюрипотентности ЭС-клеток является POU доменосодержащий транскрипционный фактор Oct4. Уровень экспрессии гена Oct4 определяет судьбу ЭС-клеток. В результате исследований механизма регуляции этого гена в клетках мыши был определен дистальный энхансер, включающий в себя два сайта — 2А и 2В. Эти сайты являются необходимыми и достаточными для активации гена. Сайт 2В содержит последовательность, способную связывать несколько белковых факторов, включая Oct4 и Sox2, присутствующие в экстрактах ЭС-клеток. В отличие от сайта 2В сайт 2А связывается с фактором, присутствующим как в ЭС-, так и в NIH 3T3-клетках.

шадя под кривой ответа в среднем на 54 % на участке в 100 мс (2641 ± 589 пА·мс в контроле, 1072 ± 146 пА·мс после применения D-AP5, парный t -тест = 3.0, $p = 0.06$, $n = 4$), что характеризует заметное изменение кинетики его нисходящей фазы. Вклад Ca^{2+} -проницаемых AMPA-рецепторов регистрировался в условиях блокады NMDA-зависимых токов 50 мкМ D-AP5. Было обнаружено, что ИЭМ-1460 практически не влияет на амплитуду одиночных ВПСП пирамидальных клеток (6.4 ± 1.4 мВ в контроле, 6.2 ± 1.5 мВ после применения ИЭМ-1460, парный t -тест = 0.82, $p = n. s.$, $n = 5$). В то же время при действии на быстро разряжающиеся интернейроны ИЭМ-1460 снижал амплитуду ВПСП примерно на 40 % (11.8 ± 3.4 мВ в контроле, 7.1 ± 2.0 мВ после применения ИЭМ-1460, парный t -тест = 2.7, $p 0.05$, $n = 8$).

Полученные данные свидетельствуют о том, что NMDA-рецепторы широко представлены в пирамидных клетках коры и могут обеспечивать вход ионов Ca^{2+} в них. Ca^{2+} -проницаемые AMPA-рецепторы в пирамидных клетках практически отсутствуют, но обеспечивают примерно 40 % от общего AMPA-ответа в быстро разряжающихся интернейронах и, следовательно, значительную Ca^{2+} проницаемость их мембран.

РОЛЬ БЕЛКА STAT5 В ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРА ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 ПРИ АКТИВАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА. © *Е. В. Митюшова, И. И. Марахова.* Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, elena-mityushova@yandex.ru.

Экспрессия полноценного рецептора интерлейкина-2 (ИЛ-2) является одним из основных событий в запуске пролиферации Т-лимфоцитов человека. В отличие от покоящихся Т-лимфоцитов, у которых рецептор ИЛ-2 состоит из β -цепи и γ_c -цепи, активированные антигеном Т-клетки экспрессируют третью субъединицу- α — и формируют гетеродимерный рецепторный комплекс $\alpha\beta\gamma_c$. При наличии ИЛ-2 только высокоаффинный $\alpha\beta\gamma_c$ -рецептор ИЛ-2 обеспечивает полноценные пролиферативный и иммунный ответы клетки. Цель работы — охарактеризовать сигнальные пути, участвующие в регуляции экспрессии α -цепи рецептора ИЛ-2 (ИЛ-2R α) в Т-лимфоцитах человека.

Показано, что в стимулированных митогенами лимфоцитах периферической крови (ЛПК) человека экспрессия ИЛ-2R α , которую оценивали по появлению маркера CD25 на поверхности клеток, имеет длительный характер и приурочена к ИЛ-2-зависимой стадии Т-клеточного ответа. При стимуляции ЛПК фитогемагглютинином (ФГА) в митогенных концентрациях (10 мкг/мл) маркер CD25 появляется на поверхности клеток не ранее чем через 4—5 ч после добавления в культуру митогена, а в интервале 5—24 ч численность клеток, экспонирующих CD25, значительно возрастает.

Для характеристики сигнальных путей, регулирующих экспрессию CD25 при запуске пролиферативного ответа ЛПК, использовали фармакологические агенты PP2 и WHI-P131, подавляющие активность тирозинкиназ Src и JAK соответственно. JAK3, ключевая тирозинкиназа на стадии цитокинзависимой активации Т-клеток, ассоциирована с ϕ_c -цепью рецептора ИЛ-2 и играет первостепенную роль в проведении сигнала. Обнаружено, что в стимулированных ЛПК WHI-P131 (50—75 мкМ) тормозит поверхностную экспрессию CD25 в интервале

24—48 ч и замедляет рост лимфоцитов, тогда как PP2 изменяет экспрессию CD25 преимущественно на ранней стадии активации ЛПК. Исследование изменений активности сигнальных белков семейства STAT (оцениваемой по уровню их фосфорилирования по тирозину методом иммунодетекции белков на блоте) показало, что WHI-P131 (но не PP2) снижает уровень фосфорилирования STAT5. Выявлена корреляция между активностью STAT5 и уровнем экспрессии ИЛ-2R α .

Полученные данные дают основание предположить, что запуск экспрессии CD25 в стимулированных митогеном ЛПК человека является двухкомпонентным: на ранней, антигензависимой стадии активации сигнал на экспрессию ИЛ-2R α может поступать через Src-киназный сигнальный путь, а длительное нарастание уровня экспрессии ИЛ-2R α регулируется с рецептора ИЛ-2 через Jak3/STAT-путь. В свете полученных данных схема регуляции экспрессии ИЛ-2R α в нормальных Т-лимфоцитах человека складывается следующим образом: экспрессия ИЛ-2R α запускается антигеном (митогеном) с Т-рецептора, а ИЛ-2, продуцируемый антигенактивированной клеткой, усиливает и продлевает экспрессию ИЛ-2R α через JAK-зависимый путь внутриклеточной сигнализации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00492-а), гранта президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-3273.2010.4) и программы президентства РАН «Молекулярная и клеточная биология».

ВЛИЯНИЕ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ НА АКТИВНОСТИ ПРОТЕАСОМ ПРИ ПОВРЕЖДЕНИЯХ ДНК. © *Т. Н. Моисеева, Н. А. Барлев.* Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, t.n.moiseeva@gmail.com.

Убиквитинзависимый протеолиз — важнейший механизм, обеспечивающий расщепление большинства клеточных белков и играющий, таким образом, ключевую роль в сигналинге, транскрипции, продвижении по клеточному циклу, дифференцировке и других важных процессах. Тонкая регуляция убиквитинзависимого протеолиза обеспечивается не только за счет сложного механизма присоединения убиквитина к белкам-субстратам, но и за счет контроля способности протеасом к расщеплению белков. Одним из важнейших способов такого контроля являются посттрансляционные модификации.

В данной работе с помощью тандемной масс-спектрометрии нам удалось выявить такие модификации субъединиц 20S-протеасом из клеток K562, как фосфорилирование, ацетилирование и убиквитинилирование. Более того, спектр данных модификаций изменялся при воздействии на клетки ДНК-повреждающего агента доксорубина, что сопровождалось увеличением всех трех пептидных активностей протеасом.

В некоторых случаях один и тот же сайт мог подвергаться как убиквитинилированию, так и ацетилированию, что позволяет предположить, что ацетилирование защищает сайт от модификации убиквитином.

Убиквитинилирование субъединиц протеасом и его влияние на способность протеасом к расщеплению белков ранее практически не изучались. В наших экспериментах убиквитинилирование протеасом *in vitro* при-

В работе также использовали рекомбинантный фрагмент мутантного хантингина, содержащий 58 глутаминовых остатков с тагом — глутатион-S-трансферазой. Этот пептид экспрессировали в бактериях *E. coli*, а затем выделяли на глутатион-сефарозе. Очищенный препарат инкубировали с ГАФДГ и различными факторами, предположительно способными связываться с ферментом, затем оценивали количество образовавшихся агрегатов. Реакцию агрегатообразования запускали добавлением в систему протеолитического фермента тромбина, специфически расщепляющего связь между полиглутаминовым трактом и тагом.

Было установлено, что в наших тест-системах как в клеточном экстракте, так и в случае с чистыми белками фармакопрепараты Добутамин и Депренил дозозависимым образом препятствуют агрегатообразованию.

Таким образом, были разработаны тест-системы для сравнительной оценки полиглутаминовых агрегатов, формирующихся при различных условиях. Было установлено, что ГАФДГ играет значительную роль в формировании агрегатов при БХ. На примере Добутамина и Депренила было показано, что низкомолекулярные соединения, специфически взаимодействующие с ГАФДГ, могут оказаться потенциальными средствами при терапии социально значимых заболеваний.

ПОЛУЧЕНИЕ АНТИТЕЛ К СУБЪЕДИНИЦАМ PSMA3, PSMA5 И PSMB5 ПРОТЕАСОМ ЧЕЛОВЕКА И ИХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ. © В. А. Ливинская, В. А. Иванов, О. А. Федорова, Н. А. Барлев, А. А. Никифоров. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, livinskaya17@mail.ru.

Протеасома — это мультисубъединичный белковый комплекс, который является основным компонентом убиквитинзависимой системы деградации белков в клетках всех архебактерий и эукариот. Этот белковый комплекс вовлечен в АТФ-зависимый протеолиз ключевых регуляторных белков, контролирующих основные клеточные процессы, такие как прохождение по клеточному циклу, дифференцировка, иммунный ответ, транскрипция и репарация ДНК, апоптоз. Изучение роли протеасом в регуляции основных жизненнонеобходимых клеточных процессов является одной из важнейших задач современной экспериментальной биологии и медицины. 26S-протеасома состоит из 20S-корового комплекса, обладающего протеолитической активностью, и 19S-регуляторного комплекса, отвечающего за узнавание и связывание полиубиквитинилированного субстрата, а также за его разворачивание и транслокацию в канал 20S-корового комплекса для последующей деградации. Коровый протеасомный комплекс 20S представляет собой полый цилиндр, образованный четырьмя кольцами, состоящими из семи различных субъединиц α -типа (PSMA1-7) (два внешних кольца), а также из семи различных субъединиц β -типа (PSMB1-7) (два внутренних кольца). Ключевыми механизмами тонкой регуляции активностей протеасом при различных изменениях физиологического состояния клетки являются посттрансляционные модификации и белок-белковые взаимодействия ее субъединиц

Целью данной работы было получение специфических антител к субъединицам PSMA3, PSMA5 и PSMB5 протеасом человека. В ходе работы были сконструированы прокариотические экспрессионные векторы

pGEX-PSMA3, pGEX-PSMA5 и pGEX-PSMB5, кодирующие GST-слитые белки GST-PSMA3, GST-PSMA5 и GST-PSMB5 соответственно. Затем белки GST-PSMA3, GST-PSMA5 и GST-PSMB5 были экспрессированы в *E. coli* и выделены методом аффинной хроматографии на глутатион-сефарозе. После иммунизации кроликов очищенными белками мы получили антитела к протеасомным субъединицам PSMA3, PSMA5 и PSMB5 и провели оценку их специфичности. Методом иммуноблоттинга было показано, что антитела к белкам PSMA3, PSMA5 и PSMA5 узнают денатурированные формы своих антигенов GST-PSMA3, GST-PSMA5 и GST-PSMB5 соответственно и эндогенных белков PSMA3, PSMA5 и PSMB5 из экстрактов различных линий клеток человека. Также было показано, что антитела к белкам PSMA3 и PSMA5 иммунопреципитируют как эндогенные, так и сверхэкспрессированные FLAG-слитые белки из экстрактов клеток человека, на основании чего можно сделать вывод о том, что они узнают нативные формы белков PSMA3 и PSMA5 соответственно. Антитела к субъединицам PSMA3, PSMA5 и PSMB5 протеасом, полученные в результате данной работы, могут быть использованы для изучения белок-белковых взаимодействий субъединиц протеасом, их посттрансляционных модификаций и других экспериментальных задач.

СООТНОШЕНИЕ ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ AMPA И NMDA В РАЗНЫХ ТИПАХ НЕЙРОНОВ ПРЕФРОНТАЛЬНОЙ КОРЫ МОЗГА КРЫС. © С. Л. Малкин, К. Х. Ким, Д. Б. Тихонов, А. В. Зайцев. Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, adresatt@gmail.com.

При ряде патологий мозговой деятельности происходят изменения в соотношении глутаматных рецепторов, обладающих различной проводимостью для ионов Ca^{2+} . Это может увеличивать вход ионов Ca^{2+} при глутаматергической передаче, что в свою очередь вызывает нарушения в функционировании нейронов и даже может приводить к их гибели. Поэтому важно знать, как изменяется вклад отдельных типов глутаматных рецепторов в реализацию постсинаптических ответов у разных классов нейронов при патологических состояниях. Первым этапом в решении этой задачи является определение соотношения этих вкладов в норме.

Исследования проводились на пирамидных клетках и интернейронах из переживающих срезов префронтальной коры мозга 2-недельных крыс методом локальной фиксации токов или потенциалов. Для фармакологической изоляции отдельных компонент суммарного ответа использовали специфический конкурентный антагонист NMDA-рецепторов D-AP5 (50 мкМ) и специфический каналоблокатор Ca^{2+} -проницаемых AMPA-рецепторов ИЭМ-1460 (100 мкМ). ГАМКергическая передача всегда блокировалась добавлением во внеклеточный раствор 10 мкМ биккуллина. Эксперименты с исследованием NMDA-зависимых токов проводились в растворе, не содержащем ионов Mg^{2+} .

Вклад NMDA-рецепторов был изучен на пирамидных клетках. Добавление во внеклеточный раствор 50 мкМ D-AP5 практически не влияло на суммарную амплитуду возбуждающего постсинаптического тока (105 пА в контроле, 116 пА после применения D-AP5, парный t -тест = 2.25, $p = n$, $n = 4$), зато приводило к уменьшению пло-

шадя под кривой ответа в среднем на 54 % на участке в 100 мс (2641 ± 589 пА·мс в контроле, 1072 ± 146 пА·мс после применения D-AP5, парный t -тест = 3.0, $p = 0.06$, $n = 4$), что характеризует заметное изменение кинетики его нисходящей фазы. Вклад Ca^{2+} -проницаемых AMPA-рецепторов регистрировался в условиях блокады NMDA-зависимых токов 50 мкМ D-AP5. Было обнаружено, что ИЭМ-1460 практически не влияет на амплитуду одиночных ВПСП пирамидальных клеток (6.4 ± 1.4 мВ в контроле, 6.2 ± 1.5 мВ после применения ИЭМ-1460, парный t -тест = 0.82, $p = n. s.$, $n = 5$). В то же время при действии на быстро разряжающиеся интернейроны ИЭМ-1460 снижал амплитуду ВПСП примерно на 40 % (11.8 ± 3.4 мВ в контроле, 7.1 ± 2.0 мВ после применения ИЭМ-1460, парный t -тест = 2.7, $p 0.05$, $n = 8$).

Полученные данные свидетельствуют о том, что NMDA-рецепторы широко представлены в пирамидных клетках коры и могут обеспечивать вход ионов Ca^{2+} в них. Ca^{2+} -проницаемые AMPA-рецепторы в пирамидных клетках практически отсутствуют, но обеспечивают примерно 40 % от общего AMPA-ответа в быстро разряжающихся интернейронах и, следовательно, значительную Ca^{2+} проницаемость их мембран.

РОЛЬ БЕЛКА STAT5 В ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРА ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 ПРИ АКТИВАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА. © *Е. В. Митюшова, И. И. Марахова.* Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, elena-mityushova@yandex.ru.

Экспрессия полноценного рецептора интерлейкина-2 (ИЛ-2) является одним из основных событий в запуске пролиферации Т-лимфоцитов человека. В отличие от покоящихся Т-лимфоцитов, у которых рецептор ИЛ-2 состоит из β -цепи и γ_c -цепи, активированные антигеном Т-клетки экспрессируют третью субъединицу- α — и формируют гетеродимерный рецепторный комплекс $\alpha\beta\gamma_c$. При наличии ИЛ-2 только высокоаффинный $\alpha\beta\gamma_c$ -рецептор ИЛ-2 обеспечивает полноценные пролиферативный и иммунный ответы клетки. Цель работы — охарактеризовать сигнальные пути, участвующие в регуляции экспрессии α -цепи рецептора ИЛ-2 (ИЛ-2R α) в Т-лимфоцитах человека.

Показано, что в стимулированных митогенами лимфоцитах периферической крови (ЛПК) человека экспрессия ИЛ-2R α , которую оценивали по появлению маркера CD25 на поверхности клеток, имеет длительный характер и приурочена к ИЛ-2-зависимой стадии Т-клеточного ответа. При стимуляции ЛПК фитогемагглютинином (ФГА) в митогенных концентрациях (10 мкг/мл) маркер CD25 появляется на поверхности клеток не ранее чем через 4—5 ч после добавления в культуру митогена, а в интервале 5—24 ч численность клеток, экспонирующих CD25, значительно возрастает.

Для характеристики сигнальных путей, регулирующих экспрессию CD25 при запуске пролиферативного ответа ЛПК, использовали фармакологические агенты PP2 и WHI-P131, подавляющие активность тирозинкиназ Src и JAK соответственно. JAK3, ключевая тирозинкиназа на стадии цитокинзависимой активации Т-клеток, ассоциирована с γ_c -цепью рецептора ИЛ-2 и играет первостепенную роль в проведении сигнала. Обнаружено, что в стимулированных ЛПК WHI-P131 (50—75 мкМ) тормозит поверхностную экспрессию CD25 в интервале 24—48

ч и замедляет рост лимфоцитов, тогда как PP2 отменяет экспрессию CD25 преимущественно на ранней стадии активации ЛПК. Исследование изменений активности сигнальных белков семейства STAT (оцениваемой по уровню их фосфорилирования по тирозину методом иммунодетекции белков на блоте) показало, что WHI-P131 (но не PP2) снижает уровень фосфорилирования STAT5. Выявлена корреляция между активностью STAT5 и уровнем экспрессии ИЛ-2R α .

Полученные данные дают основание предположить, что запуск экспрессии CD25 в стимулированных митогеном ЛПК человека является двухкомпонентным: на ранней, антигензависимой стадии активации сигнал на экспрессию ИЛ-2R α может поступать через Src-киназный сигнальный путь, а длительное нарастание уровня экспрессии ИЛ-2R α регулируется с рецептора ИЛ-2 через Jak3/STAT-путь. В свете полученных данных схема регуляции экспрессии ИЛ-2R α в нормальных Т-лимфоцитах человека складывается следующим образом: экспрессия ИЛ-2R α запускается антигеном (митогеном) с Т-рецептора, а ИЛ-2, продуцируемый антигенактивированной клеткой, усиливает и продлевает экспрессию ИЛ-2R α через JAK-зависимый путь внутриклеточной сигнализации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00492-а), гранта президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-3273.2010.4) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

ВЛИЯНИЕ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ НА АКТИВНОСТИ ПРОТЕАСОМ ПРИ ПОВРЕЖДЕНИЯХ ДНК. © *Т. Н. Моисеева, Н. А. Барлев.* Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, t.n.moiseeva@gmail.com.

Убиквитинзависимый протеолиз — важнейший механизм, обеспечивающий расщепление большинства клеточных белков и играющий, таким образом, ключевую роль в сигналинге, транскрипции, продвижении по клеточному циклу, дифференцировке и других важных процессах. Тонкая регуляция убиквитинзависимого протеолиза обеспечивается не только за счет сложного механизма присоединения убиквитина к белкам-субстратам, но и за счет контроля способности протеасом к расщеплению белков. Одним из важнейших способов такого контроля являются посттрансляционные модификации.

В данной работе с помощью тандемной масс-спектрометрии нам удалось выявить такие модификации субъединиц 20S-протеасом из клеток K562, как фосфорилирование, ацетилирование и убиквитинилирование. Более того, спектр данных модификаций изменялся при воздействии на клетки ДНК-повреждающего агента доксорубина, что сопровождалось увеличением всех трех пептидных активностей протеасом.

В некоторых случаях один и тот же сайт мог подвергаться как убиквитинилированию, так и ацетилированию, что позволяет предположить, что ацетилирование защищает сайт от модификации убиквитином.

Убиквитинилирование субъединиц протеасом и его влияние на способность протеасом к расщеплению белков ранее практически не изучались. В наших экспериментах убиквитинилирование протеасом *in vitro* при-

водило к подавлению их пептидазных активностей, что свидетельствует в пользу гипотезы об участии данной модификации в регуляции способности протеасом к расщеплению белков.

Исследование наличия утяжеленных изоформ субъединицы альфа5 во фракциях различной плотности с помощью Вестерн-блоттинга с антителами к альфа5 позволило выявить различия между модифицированными вариантами данного белка в протеасомной фракции и во фракциях, соответствующих внепротеасомным субъединицам. Аналогичные результаты были получены при сверхэкспрессии субъединицы альфа5, слитой с эпитопом FLAG, в клетках H1299 при помощи Вестерн-блоттинга с антителами к эпитопу FLAG. Это позволяет предположить важность убиквитинилирования не только в регуляции протеолитических активностей протеасом, но и при сборке протеолитических частиц.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-01234) и программы Министерства образования и науки РФ (госконтракт 16.740.11.0366).

ВЛИЯНИЕ ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ИНСУЛИНА НА АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНУЮ СИГНАЛЬНУЮ СИСТЕМУ В ТКАНЯХ КРЫС С НЕОНАТАЛЬНОЙ МОДЕЛЬЮ САХАРНОГО ДИАБЕТА. © И. В. Мойсеюк, О. В. Чистякова, К. В. Деркач, В. М. Бондарева, А. О. Шнаков. Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, irina.moiseyuk@mail.ru.

Изменение функциональной активности аденилатциклазной (АЦ) гормональной сигнальной системы и ее чувствительности к действию гормонов в нервной, сердечно-сосудистой и репродуктивной системах лежит в основе развития осложнений при сахарном диабете (СД). Нами были изучены функциональное состояние АЦ сигнальной системы в мозге, миокарде, яичниках и матке у крыс с неонатальной моделью СД и влияние интраназального введения инсулина на чувствительность этой системы к действию биологических аминов и полипептидных гормонов. Регуляторные эффекты соматостатина и 5-НТ_{1B}R-агониста 5-нонилоситриптамина, действующих через рецепторы, сопряженные с G_i-белком, были значительно снижены при СД и частично восстанавливались при введении интраназального инсулина. Эффекты гормонов, активаторов АЦ сигнальной системы, изменялись ткане- и рецепторспецифичным образом и восстанавливались после интраназального введения инсулина практически до контрольного уровня. У контрольных крыс при интраназальном действии инсулина стимулирующие эффекты изопротеренола и релаксина в миокарде, а также эффект человеческого хорионического гонадотропина в яичниках были снижены, в то время как эффекты гормонов, ингибиторов АЦ, возрастали. Сделан вывод о том, что при интраназальном введении инсулина действие гормонов на АЦ сигнальные пути, связанные с G_i-белком, усиливается в мозге, миокарде, яичниках и матке у крыс, что позволяет расширить возможность терапевтического применения интраназального инсулина.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине» (2009—2011 гг.) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00746).

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПЕПТИДОВ, СООТВЕТСТВУЮЩИХ ТРЕТЬЕЙ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ ПЕТЛЕ РЕЦЕПТОРА ТИРЕОТРОПИНА. © И. В. Мойсеюк, Е. А. Шнакова, О. В. Чистякова, К. В. Деркач, А. О. Шнаков. Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, irina.moiseyuk@mail.ru.

В последние годы пептидная стратегия широко применяется для изучения молекулярных механизмов передачи гормональных сигналов в клетку и для создания высокоселективных регуляторов гормональных сигнальных систем. Наиболее перспективным ее направлением являются синтез и изучение пептидов, производных цитоплазматических петель (ЦП) рецепторов серпантинного типа, которые селективно взаимодействуют с G-белками, запускают сигнальные каскады в отсутствие гормона и влияют на передачу сигнала через гомологичный им рецептор. Цель исследования состояла в разработке селективных регуляторов рецептора тиреотропного гормона (ТТГ) на основе пептида Gln-Tyr-Asn-Pro-Arg-Asp-Lys-Asp-Thr-Lys-Ile-Ala-Lys-Arg-Nle-Ala^{6GI-627}-Lys-Ala-амид (I) и его пальмитоилированного аналога (II), производных С-концевого участка 612—627 третьей ЦП (С-ЦП-3) рецептора ТТГ, и изучения их активности *in vitro* и *in vivo*. Пальмитоилированный пептид II в микромолярных концентрациях повышал базальный уровень ГТФ-связывания G-белков во фракциях мембран щитовидной железы, причем его действие было селективным и реализовывалось через G_s-белки. Пептид I был намного менее активен, чем его пальмитоилированный аналог, что хорошо согласуется с ранее полученными данными о более высокой активности пептидов, модифицированных гидрофобными радикалами. Пептид II снижал стимулирующий эффект ГТФ-связывания ТТГ, но практически не влиял на соответствующие эффекты других гормонов, что свидетельствует о его рецепторной специфичности, и был наиболее активен в щитовидной железе, обогащенной гомологичными ему рецепторами, что указывает на его тканевую специфичность. Полученные данные доказывают ключевую роль С-ЦП-3 рецептора ТТГ во взаимодействии с G_s-белками и в передаче гормонального сигнала к цАМФ-зависимым каскадам. Интраназальное введение крысам пептида II в дозе 450 мкг на 1 кг массы вызывало изменение уровня свободного T₄, причем если после первой, 5-дневной, серии уровень T₄ повышался на 34 %, то после второй, 10-дневной, он, напротив, снижался на 23 %. При введении крысам пептида II в дозе 90 мкг на 1 кг массы после первой серии уровень T₄ практически не менялся, а впоследствии снижался на 18—23 %. Уровень T₃ мало изменялся как после первой, так и после второй серии при использовании обеих доз пептида II. Таким образом, пептид II вызывает изменения функциональной активности щитовидной железы, которые, как мы полагаем, связаны с начальными этапами передачи генерируемого ТТГ сигнала. Выявленная как *in vitro*, так и *in vivo* биологическая активность пальмитоилированного пептида 612—627 указывает на перспективность модификации пептидов, производных ЦП рецепторов, гидрофобными радикалами

с целью создания на их основе высокоселективных регуляторов гормональных сигнальных систем.

Работа выполнена при финансовой поддержке программой президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине» (2009—2011 гг.) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00746).

ЭКСПРЕСС-ТЕСТЫ ДЛЯ ПРОВЕРКИ ПАРАМЕТРОВ ЛАЗЕРНОГО СКАНИРУЮЩЕГО КОНФОКАЛЬНОГО МИКРОСКОПА. © А. С. Назимов. С.-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ant_nz@mail.ru.

Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия в настоящее время широко применяется при проведении медико-биологических исследований, в материаловедении и других областях. Конфокальный микроскоп является сложным оптико-электронным прибором, и получение изображения высокого качества зависит не только от правильного выбора типа объектива, длины волны и мощности лазерного излучения, спектрального диапазона и усиления фотоприемников, параметров сканера и размера конфокальной диафрагмы, но и от юстировки и калибровки, осуществляемой фирмой-изготовителем и ее сервисными службами. Специалисты используют для этого техническую документацию, специальную аппаратуру, тестовые программы и электронные ключи, которые пользователям не предоставляются. Нами разработаны несложные методики, алгоритмы и тест-объекты для самостоятельной проверки параметров конфокального микроскопа.

Основным параметром конфокального микроскопа является разрешающая способность, которая подразделяется на латеральную и аксиальную. Пределы латеральной и аксиальной разрешающей способности конфокального микроскопа зависят от одних и тех же величин: длины волны возбуждающего света, числовой апертуры объектива и показателя преломления иммерсии. Поэтому, измерив аксиальную разрешающую способность с помощью простого теста с использованием зеркала, можно оценить и латеральную разрешающую способность. С помощью зеркала оцениваются также хроматические aberrации микроскопа. Для прямого измерения латеральной разрешающей способности и ее асимметрии нами разработан специальный тест-объект, выполненный методом электронно-лучевой литографии и представляющий собой радиально расходящиеся лучи переменного размера (min 50 нм). Стабильность лазерных источников света и равномерность освещенности оцениваются по люминесценции стекла марки ЖС19. Геометрическая калибровка проверяется по объект-микрометру для обычной микроскопии, а спектральная калибровка — по отраженному излучению какой-либо лазерной линии в режиме спектрального сканирования. Юстировку лазерных источников света можно проверить по смещению изображений окрашенных несколькими флуорохромами микросфер (1 мкм) в разных спектральных диапазонах.

Комплексная проверка правильности работы прибора проводится по широко используемому в конфокальной микроскопии препарату — поперечному срезу корня ландыша (*Convallaria majalis*), обладающего автофлуоресценцией в широком спектральном диапазоне и имеющего тонкие хорошо различимые клеточные стенки. Можно ис-

пользовать также препараты клеток, окрашенных для визуализации тонких структур, например цитоскелета, или меченных полупроводниковыми наночастицами (quantum dots).

РОЛЬ ДИПОЛЬНЫХ МОДИФИКАТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ МЕМБРАННОЙ АКТИВНОСТИ ЭКЗОГЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ. © О. С. Остроумова, С. С. Ефимова, В. В. Малев, Л. В. Щагина. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ostroumova@mail.cytspb.rssi.ru.

Взаимодействие некоторых экзогенных соединений (например, многих токсинов и антимикробных пептидов) с мембраной приводит к нарушению ее барьерных функций в результате образования ионпроницаемых трансмембранных пор, последующему разрушению мембраны и гибели клетки. Одним из факторов, определяющих взаимодействие биологически активных веществ с мембраной клеток-мишеней, является дипольный потенциал (ДП), обусловленный специфической ориентацией диполей воды и липидов на границе раздела фаз. ДП можно варьировать с помощью мембраноактивных агентов, дипольных модификаторов (ДМ). Разрозненные литературные сведения о влиянии ДМ на мембранный транспорт, отсутствие систематизации имеющихся данных, недостаточность круга объектов исследования и потенциальная практическая значимость определили основную цель данной работы — установление молекулярных механизмов влияния ДМ на каналобразующую активность токсинов и антимикробных соединений. Для решения поставленных задач использовался метод формирования модельных плоских бислойных липидных мембран. В качестве каналобразующих веществ были использованы противогрибковые циклические липодепептиды *Pseudomonas syringae* сирингомидин Е (СМЕ) и сирингопептин 22А (СПА), антибактериальный липопептид *Bacillus subtilis* сурфактин (СА), белковый токсин *Staphylococcus aureus* альфа-гемолизин (АГЛ) и полиеновый антимикотик *Streptomyces nodosus* амфотерицин В (АмВ); в качестве ДМ были выбраны флавоноиды (флоретин, флоридзин и кверцетин), стироловые красители серии RH (RH 421, RH 237 и RH 160), стерин (холестерин, 6-кетохолестанол, 7-кетохолестанол и 5-альфа-андростан-3-бета-ол).

Анализ полученных результатов позволил выявить основные механизмы влияния ДМ на мембранную активность экзогенных соединений.

1. Изменение заряд-дипольных и диполь-дипольных взаимодействий в мембране, которое обуславливает изменение равновесного числа открытых каналов СМЕ, СПА, СА и АмВ и модификацию многоуровневой проводимости каналов СМЕ и СА при введении ДМ.

2. Изменение заряд-дипольных взаимодействий в канале, которое определяет влияние ДМ на проводимость каналов СМЕ, СПА и АмВ.

3. Образование водородных связей и(или) π - π -взаимодействий между ДМ и каналобразующими молекулами. В рамках этого механизма могут быть объяснены увеличение потенциал-чувствительности канала АГЛ при введении флоретина и кверцетина, а также изменение проводимости и равновесного числа открытых каналов АмВ при введении флоретина, кверцетина и RH 421.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследова-

дований (проект 09-04-00883), программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», грантов президента РФ (НШ-3796.2010.4) и ГК № П1372 (МК-1813.2012.4).

ЭКСПРЕССИЯ ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫХ МАРКЕРОВ ПРИ ЗАДНЕЙ РЕГЕНЕРАЦИИ У ПОЛИХЕТЫ *PLATYNEREIS DUMERILII*. © А. В. Петухов, Р. П. Костюченко. С.-Петербургский государственный университет, alexeuskhalin@gmail.com.

Как и все полихеты, *P. dumerilii* имеет ярко выраженную сегментацию тела, однако формирование ларвальных и постларвальных сегментов осуществляется по-разному. Ларвальные сегменты возникают одновременно путем сегментации тела личинки, постларвальные образуются последовательно, благодаря деятельности зоны роста. Способность полихет к регенерации широко известна, но не универсальна и может различаться как у различных видов, так и у животных одного вида в зависимости от места операции. Учитывая эти и другие различия в построении ларвального и постларвального тел в норме и при регенерации, встает вопрос о различиях клеточных и молекулярных механизмов формирования ларвальных и постларвальных частей тела и систем, в частности производных эктодермы. В данной работе проведен сравнительный анализ экспрессии тканеспецифичных маркеров при восстановлении брюшной нервной цепочки (по-видимому, образующейся из пула малодифференцированных клеток эпителия), а также эктодермальной задней кишки в процессе задней регенерации и особенностей экспрессии этих маркеров в нормальном ларвальном и постларвальном развитии. В частности, методом молекулярной гибридизации *in situ* на целых объектах (метод WMISH) показана экспрессия тканеспецифичного маркера нервной системы (НС) *pax 3/7* (*paired box 3/7*), консервативность паттерна экспрессии которого была показана в развитии ЦНС аннелид и позвоночных животных (Denes et al., 2007), маркера эктодермального отдела задней кишки *bra* (*brachyury*), играющего существенную роль в формировании заднего отдела тела как у первичноротых, так и у вторичноротых животных, а также гена *foxA2* (*forkhead box A2*), функции которого связаны с формированием эктодермальных отделов кишечника и центральных отделов НС на всех рассмотренных нами стадиях. В постларвальном развитии и при регенерации паттерн экспрессии *Pdu-pax3/7* в целом соответствует паттерну его экспрессии в личиночном развитии. При этом стоит отметить, что экспрессия *Pdu-pax3/7* в процессе задней регенерации наблюдается только спустя более 2 сут. Экспрессии *Pdu-bra* и *Pdu-foxA2* выявлена нами в области эктодермального отдела задней кишки, помимо этого, экспрессия *Pdu-foxA2* детектируется в ганглиях брюшной нервной цепочки. Таким образом, характер экспрессии изученных нами тканеспецифичных маркеров при задней регенерации у полихеты *P. dumerilii* проявляет высокую степень консервативности как в личиночном развитии, так и при постларвальном формировании новых сегментов, в том числе при регенерации.

ФОЛДИНГ, СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ АКТИНА. © О. И. Поварова, И. М. Кузнецова, К. К. Туроверов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, olp@incras.ru.

Актин является одним из наиболее распространенных и вездесущих белков живых организмов. Белок был открыт еще в середине XIX столетия как один из основных белков системы мышечного сокращения. Кроме того, актин также является основным белком цитоскелета эукариотических клеток, участвует в процессах хемотаксиса и межклеточного взаимодействия. Актин обнаруживают в цитоплазме и межклеточном пространстве. Он также содержится в ядрах клеток и участвует в реорганизации структуры хроматина, в транскрипции за счет образования комплекса с РНК-полимеразой и т. п.

В течение последних 50 лет понимание того, что представляет собой нативное состояние белка и за счет чего оно возникает, как происходят денатурация и ренатурация белка, претерпело существенные изменения. Длительное время нативное состояние ассоциировалось с компактным глобулярным состоянием, а денатурированное — с полностью развернутым состоянием, напоминающим состояние клубка для синтетических полимеров в хорошем растворителе. Представление о том, что в нативном состоянии белок имеет жесткую, строго упорядоченную структуру, нашло подтверждение в экспериментально установленной способности глобулярных белков в нативном состоянии образовывать кристаллы, что позволило к настоящему времени определить пространственную структуру многих тысяч белков. За последние 10 лет накопились данные, свидетельствующие о том, что многие белки могут выполнять свою функцию, будучи частично или полностью неупорядоченными. Было установлено, что эти белки приобретают упорядоченное компактное состояние в составе комплексов при взаимодействии с лигандами, другими белками или нуклеиновыми кислотами. Основная функция этих белков как раз и состоит в узнавании своих партнеров и образовании комплексов с ними. Поскольку признаком, определяющим нативность белка, является способность выполнять присущую ему функцию, такие частично или полностью неупорядоченные белки следует считать нативными. Степень неупорядоченности в белках может быть разной, граница между глобулярными и внутренне неупорядоченными белками условна. Многие белки, которые было принято считать глобулярными, имеют неупорядоченные области. К числу таких белков, с нашей точки зрения, может быть отнесен и актин, хотя до сих пор его принято было считать глобулярным. Наличие ряда петлевых участков, в том числе участвующих в образовании межмолекулярных контактов при полимеризации, позволяет рассматривать его как белок с внутренне неупорядоченной структурой. Актин принимает компактное состояние только после связывания лигандов — иона Ca^{2+} и молекулы АТФ, и его фолдинг невозможен без системы «помощников», в качестве которых у актина выступают шаперон Hsp70, префолдин и шаперонин ССТ. Сходя с рибосомы, полипептидная цепь актина сначала взаимодействует с Hsp70, потом префолдин переносит его на шаперонин ССТ, далее происходит ряд преобразований, после которых актин становится нативным. Помимо фибриллярного в клетке существует и мономерный глобулярный актин, но только в комплексе с другими белками. Интересно отметить, что так называемый инактивированный актин, образующийся из глобулярного актина при различных воздействиях, образует гомогенный ассоциат, состоящий из 14—16 субъединиц. Не исключено, что и эта форма актина может быть функционально значимой.

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА P68 В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ U937 ПРИ ОБРАБОТКЕ КЛЕТОК ФОРБОЛОВЫМ ЭФИРОМ. © Н. В. Пономарцев, Н. И. Енукашвили. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ponomartsev@yandex.ru.

Белок p68 относится к семейству содержащих DEAD-боксы РНК-хеликаз. Это мультифункциональный белок, он может принимать участие во всех этапах РНК метаболизма от транскрипции до деградации, а также вовлекаться в процессы пролиферации и дифференцировки клеток. В нашей работе показано кратковременное повышение экспрессии p68 при дифференцировке клеток. В эксперименте мы использовали суспензионную моноцитоподобную клеточную линию U937 человека. Клетки этой линии способны при действии различных агентов дифференцироваться в макрофагоподобные клетки, утрачивая способность к пролиферации и приобретая специфические макрофагальные маркеры. В качестве агента, стимулирующего клетки к дифференцировке, мы использовали форболовый эфир. Клетки культивировали в присутствии форболового эфира от 1—10 и 24 ч с форболовым эфиром, а затем в течение 24 ч — без него. Далее клетки окрашивали антителами против p68 и CR3 (CD11b/CD18, маркер макрофагов) и анализировали на проточном цитометре. Примерно через 0.5 ч после внесения форболового эфира в клеточную культуру часть клеток адгезировала на поверхности чашек Петри и изменяла форму. При этом в первые 2 ч после внесения форболового эфира наблюдалось повышение количества p68 в клетках по сравнению с клетками, не обработанными форболовым эфиром. Далее концентрация p68 снижалась, и в клетках, которые культивировали 5, 10 или 24 ч в присутствии форболового эфира, концентрация p68 была меньше, чем в контрольных недифференцированных клетках, тогда как концентрация CR3 на поверхности макрофагов возрастала только в клетках, которые культивировали в среде с форболовым эфиром более 24 ч. Таким образом, показано, что при дифференцировке концентрация белка p68 в клетках U937 возрастает, что, возможно, отражает необходимость этого белка на начальной стадии дифференцировки клеток. После прохождения основного этапа дифференцировки и утраты способности к пролиферации концентрация p68 в клетках U937 снижается.

РАЗЛИЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ НАРУШЕНИЯ ФУНКЦИЙ БЕЛКА ПРЕСЕНИЛИН-1 НА ДЕПОУПРАВЛЯЕМЫЙ КАЛЬЦИЕВЫЙ ВХОД. © А. А. Пупышев, М. А. Рязанцева, И. А. Поздняков, Л. Н. Глушанкова, Е. В. Казначеева. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, mariaandreevna@gmail.com.

Депоуправляемый кальциевый вход представляет собой входящий ток ионов Ca^{2+} в цитоплазму клетки через плазматическую мембрану (ПМ) в ответ на понижение концентрации свободного кальция в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР). Нарушение депоуправляемого входа кальция связывают с патологией болезни Альцгеймера. В экспериментальных условиях депоуправляемый кальциевый вход можно активировать с помощью селективного блокатора кальцевой АТФазы SERCA тапсигаргина. При блокировании SERCA приостанавливается накачивание кальция в просвет ЭР, а имеющийся в просвете кальций выходит по градиенту концентрации в цитоплазму.

До 80 % выхода кальция из ЭР в нейронах происходит через каналы утечки, образованные белком пресенилин-1 (PS1). Белок PS1 в процессированном состоянии является одним из основных компонентов протеазного комплекса γ -секретазы, осуществляющей разрезание фрагментов белка APP с образованием A β , а также разрезание NOTCH.

На клетках человеческой нейробластомы линии SK-N-SH нами исследовался характер влияния различных типов мутаций в гене белка PS1, приводящих к понижению (PS1 M146V) или к повышению (PS1 Δ E9) проводимости канала белка PS1, потере активности γ -секретазы, но не затрагивающей функцию канала PS1 (PS1 D257A), на депоуправляемый кальциевый вход. Была произведена трансфекция клеток нейробластомы с помощью плазмид с соответствующими мутантными генами белка PS1. В качестве контроля использовалась плазида с геном PS1 дикого типа. Для селекции трансфицированных клеток в ходе электрофизиологического эксперимента была проведена котрансфекция с плазмидой GFP. Оверэкспрессия мутантных белков подтверждена с помощью Вестерн-блоттинга. С помощью метода локальной фиксации потенциала (patch-clamp technique) в конфигурации whole-cell было показано подавление депоуправляемого входа кальция, активированного с помощью тапсигаргина, в клетках нейробластомы с мутацией PS1 M146V, снижающей проводимость канала утечки по сравнению с клетками, трансфицированными PS1 дикого типа. Эффект подавления выражался в понижении скорости активации и амплитуды тока депоуправляемого входа кальция. Противоположный эффект наблюдался в клетках с мутацией PS1 Δ E9, повышающей проводимость канала PS1. В данных клетках наблюдалось значительное увеличение скорости активации тока депоуправляемого входа кальция по сравнению с контролем. В клетках с мутацией PS1 D257A не было обнаружено отличий в скорости активации или амплитуде тока по сравнению с клетками с PS1 дикого типа. Следовательно, к нарушению депоуправляемого входа кальция в клетках нейробластомы человека линии SK-N-SH приводят исключительно мутации в гене белка PS1, изменяющие проводимость канала белка PS1. По всей видимости, активность γ -секретазы и регулируемые ею сигнальные пути (APP, NOTCH) в данной клеточной линии не имеют значительного влияния на депоуправляемый кальциевый вход.

Работа выполнена при финансовой поддержке Госконтрактов № 14.740.11.0924, П332 Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 10-04-00956, 10-04-01002 и 11-04-12047) и гранта президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-3796.2010.4).

ИНДУЦИРОВАННЫЕ ЭТАНОЛОМ ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ГЕПАТОЦИТАХ КРЫС: ВЫБОР РЕФЕРЕНТНЫХ ГЕНОВ. © А. Л. Рунов, А. Г. Миттенберг, М. С. Вонский. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, tsinakan@gmail.com.

Известно, что профиль экспрессии генов в клетках организма значительно изменяется при воздействии внешних факторов. Для оценки произошедших изменений важен выбор референтных генов, экспрессия которых не зависит от действия исследуемого фактора. Задачей данной работы был выбор референтных генов, экспрессия

которых не меняется в гепатоцитах крыс после введения в их рацион этанола.

На основании литературных данных было отобрано 10 генов, экспрессия которых у крыс считается конститутивной и не зависящей от внешних факторов. Были подобраны системы праймеров и на геномной ДНК проведена оптимизация условий проведения ПЦР.

В ежедневный рацион крыс Вистар в течение 2 мес вводили этанол (40 и 4 %), а также пиво в количествах, эквивалентных 1 SKU (0.5 л для человека). Крысы контрольной группы получали воду. В состав каждой группы входили 6 самцов и 6 самок. По истечении 2 мес животные всех групп были декапитированы. Из печени крыс выделяли мРНК методом фенольной экстракции. Чистоту и концентрацию выделенной РНК определяли спектрофотометрически. Целостность мРНК оценивали с помощью электрофореза в денатурирующем геле. Экспрессию генов оценивали по содержанию мРНК, определяемому методом обратной транскрипции с последующей количественной полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР).

Сравнительный анализ экспрессии генов показал, что неизменной для всех групп крыс остается экспрессия лишь 3 генов из 10 исследованных: глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*GAPDH*), фосфоглицерат-киназы 1 (*Pgk1*) и аполипротеина E (*ApoE*). В связи с тем что значение порогового цикла для *GAPDH* оказалось наиболее близким к среднему значению пороговых циклов для генов-мишеней, *GAPDH* был выбран качестве опорного гена для дальнейшего исследования индуцированных этанолом изменений экспрессии генов в гепатоцитах крыс.

ИЗМЕНЕНИЯ РАБОТЫ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ В МОДЕЛЯХ НАСЛЕДСТВЕННОЙ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА. © М. А. Рязанцева, И. А. Поздняков, С. В. Львовская, Л. Н. Глушанкова, Е. В. Казначеева. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, mariaandreevna@gmail.com.

Нарушение кальциевой сигнализации в нейронах рассматривается как одна из причин развития болезни Альцгеймера. В 50 % случаев наследственной болезни Альцгеймера (НБА) наблюдались мутации в белке пресенилина-1 (PS1). Белок PS1 образует кальциевые каналы в мембране эндоплазматического ретикула (ЭР), регулирующие пассивный отток Ca^{2+} из просвета ЭР в цитоплазму. Мутация PS1 M146V вызывает потерю функции канала, а при мутации PS1 DE9 показана повышенная проводимость канала. Было сделано предположение о том, что депоуправляемые кальциевые каналы, активирующиеся в ответ на понижение концентрации свободного Ca^{2+} в ЭР, могут принимать участие в развитии патологии НБА, вызванной мутациями в белках пресенилинах. С помощью метода локальной фиксации потенциала (patch-clamp technique) в конфигурации whole-cell было показано подавление депоуправляемого входа кальция в первичной культуре нейронов гиппокампа мышинной модели НБА (KI-PS1 M146V, Thy1-APPKM670/671NL и Thy1-tauP301L) по сравнению с нейронами мышей дикого типа. Подавляющее действие мутантного PS1 M146V на депоуправляемый вход кальция было подтверждено в экспериментах с оверэкспрессией в клетках нейробластомы SK-N-SH и первичной культуре нейронов гиппокампа. В этих же клетках с оверэкспрессией мутантного PS1 DE9 наблюдался противоположный эффект на депоуправляе-

мый вход кальция, выражающийся в увеличении скорости активации и амплитуды тока. В качестве контроля использовались клетки с оверэкспрессией PS1 дикого типа. Хелатирование Ca^{2+} в просвете ЭР с помощью низкоаффинного хелатора TPEN убирало эффект подавления депоуправляемого входа кальция при экспрессии мутантного PS1 M146V и эффект усиления при экспрессии мутантного PS1 DE9. Основной эффект мутантных PS1 не был обусловлен изменением уровня экспрессии основных белков, детерминирующих депоуправляемый вход кальция, таких как каналы субъединицы TRPC1 и Orai1 или кальциевые сенсоры ЭР STIM1 и STIM2. Эксперименты с использованием измерения концентрации цитоплазматического кальция с помощью флуорофора Fura-2AM показали, что мутация PS1 M146V вызывает значительное увеличение стабильной концентрации кальция в ЭР нейронов гиппокампа, а мутация PS1 DE9 вызывает ее понижение. Однако подобных изменений в аналогичных экспериментах не было отмечено в нейронах стриатума, не подвергающихся дегенерации при НБА. Следовательно, причина патологического нарушения работы депоуправляемых кальциевых каналов при НБА в нейронах гиппокампа заключается в нарушениях работы каналов утечки Ca^{2+} , вызванных мутациями в гене белка PS1, изменяющих стабильную концентрацию кальция в ЭР.

Работа выполнена при финансовой поддержке Госконтрактов № 14.740.11.0924, П332, Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 10-04-00956, 10-04-01002 и 11-04-12047) и гранта президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-3796.2010.4).

СРАВНЕНИЕ ЭНДОЦИТОЗА КОМПЛЕКСОВ ЭФР—КВАНТОВЫЕ ТОЧКИ С ЭНДОЦИТОЗОМ РЕЦЕПТОРА ЭФР. © А. В. Салова, Е. А. Леонтьева, Т. П. Моженок, Е. С. Корнилова, С. А. Кроленко, Т. Н. Беляева. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, avsalova@gmail.com.

Рецептор ЭФР играет важную роль в регуляции клеточной пролиферации, дифференцировки, выживания при апоптозе и подвижности. Подавляющая масса работ по исследованию эндоцитоза рецептора ЭФР выполнена на фиксированных клетках, данные по динамике эндоцитоза на живых клетках практически отсутствуют. Для визуализации внутриклеточных процессов в живых клетках достаточно широко используются квантовые точки (КТ), обладающие уникальными оптическими свойствами. Однако недостаточно освещен вопрос влияния КТ на процессы, в которых участвуют меченные ими молекулы.

В настоящей работе было проведено сравнение эндоцитоза комплексов ЭФР-КТ с эндоцитозом рецептора ЭФР. В работе использовали CdSe/ZnS КТ (Invitrogen, США), конъюгированные с ЭФР через систему стрептавидин/биотин. Исследования проводили на живых и фиксированных клетках HeLa и A431. Проанализированы основные стадии эндоцитоза комплексов ЭФР-КТ и рецептора ЭФР. Особое внимание уделено изучению связывания ЭФР-КТ с рецептором и начальных стадий интернализации. Изучено влияние различных концентраций и соотношений ЭФР и КТ на количество эндосом, образовавшихся после стимуляции эндоцитоза. Исследовано влияние ингибиторов различных стадий эндоцитоза (диасора, гипертонического раствора сахарозы и вортманнина) на эндоцитоз как рецептора ЭФР, так и комплексов

ЭФР-КТ. Проведено сравнение колокализации ЭФР-КТ и рецептора ЭФР с маркерами структур, характерных для различных стадий эндоцитоза.

Полученные результаты позволяют считать, что меченое ЭФР с помощью КТ не влияет на протекание таких стадий, как формирование эндосом, их слияние, транспортировка по микротрубочкам и формирование мультивезикулярных эндосом. Показано, что комплекс ЭФР-КТ задерживается в мультивезикулярных поздних эндосомах в течение более длительного времени, чем ЭФР. Обнаружено, что соотношение ЭФР и КТ влияет на эффективность интернализации рецептора. Учитывая то, что многие злокачественные новообразования ЖКТ, легких и других органов связаны с гиперэкспрессией рецептора ЭФР, использование ЭФР-рецепторной системы и КТ открывает возможность выявления трансформированных клеток на самых ранних стадиях возникновения опухоли, фактически на уровне единичных клеток.

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

УЧАСТИЕ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В АГРЕГАЦИИ МУТАНТНОЙ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ. © Д. В. Свечинский. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, sverchinsky@gmail.com.

В основе многих нейродегенеративных заболеваний лежит образование внутриклеточных белковых агрегатов. Для ряда таких заболеваний показано активное вовлечение в агрегаты фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФДГ). Одним из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний является латеральный амиотрофический склероз. Считается, что частой причиной возникновения данного заболевания является мутация G83A в гене, кодирующем супероксиддисмутазу-1 (СОД-1) — фермент, входящий в комплекс антиоксидантной защиты. Основной целью данного исследования было изучение механизмов агрегации мутантной СОД-1 в клеточной модели латерального амиотрофического склероза, с вовлечением в агрегацию ГАФДГ.

Для исследования нами были выбраны клетки нейробластомы человека линии SK-N-SH. Для изучения агрегации клетки трансфицировались плазмидой, несущей ген, кодирующий мутантную СОД-1, и таг — ген усиленного зеленого флуоресцентного белка (EGFP). Для исследования динамики агрегации мы трансфицировали клетки, а затем каждые 12 ч начиная с 24 ч после трансфекции отбирали и лизировали эти клетки. С помощью аппарата для дот-блоттинга агрегаты из лизата переносили на ацетатцеллюлозную мембрану (метод ловушки на фильтре), после чего количество агрегатов оценивалось по интенсивности свечения антител к EGFP. Результаты данного опыта показали, что крупные белковые агрегаты формируются к 48 ч после трансфекции клеток.

Для выявления участия ГАФДГ в агрегации мутантной СОД-1 клетки SK-N-SH трансфицировали одновременно плазмидой, содержащей мутантный ген СОД-1 и таг EGFP, и малой интерферирующей РНК, подавляющей экспрессию ГАФДГ. После этого клетки лизировали, лизаты анализировали с помощью метода ловушки на фильтре. Результаты этого опыта говорят о том, что снижение

концентрации ГАФДГ приводит к значительному уменьшению количества агрегатов СОД-1. Значит, ГАФДГ не только включается в агрегаты, но и играет существенную роль в их образовании. После получения данных о значимости участия ГАФДГ в процессе агрегации нами были поставлены опыты по изучению механизма взаимодействия ГАФДГ и СОД-1 в агрегатах. Для проверки гипотезы о том, что образование агрегатов идет с помощью дисульфидных связей, в клеточный лизат добавляли дитиотреитол (ДТТ), разрушающий дисульфидные связи. Кроме того, в лизат добавляли ДСН, разрушающий нековалентные связи. Данный опыт показал, что добавление ДТТ в пробы уменьшает количество агрегатов, но незначительно. Это говорит о том, что ГАФДГ может вовлекаться в агрегаты СОД не только путем образования дисульфидных связей, но также возможен и другой механизм агрегации.

АНАЛИЗ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДОЛГОЖИТЕЛЕЙ. © Т. Ю. Смирнова,¹ А. Л. Рунов,¹ Д. Л. Спивак,² А. Г. Захарчук,³ В. М. Михельсон,¹ И. М. Спивак.¹ ¹Институт цитологии РАН, ²Институт мозга человека РАН, Санкт-Петербург, и ³Городской геронтологический медико-социальный центр Санкт-Петербурга им. Э. С. Пушковой, tatiana.smirnova@live.ru.

В последнее время в геронтологии в качестве маркеров старения стали интенсивно изучаться концевые участки хромосом — теломеры. Повышенный интерес к данным специализированным комплексам определяется уникальными функциями, которые они выполняют в процессах клеточной пролиферации и в поддержании стабильности генома. Однако данные литературы о взаимосвязи длины теломер с риском развития различных возрастных патологий и продолжительностью жизни в настоящее время противоречивы. Большинство исследований показывает зависимость длины теломерных повторов от возраста и пола (Frenck et al., 1998; Tauchi et al., 1999), в то же время существуют работы, не обнаружившие ассоциации длины теломер с риском смертности людей старшего возраста (Martin-Ruiz et al., 2005; Bischoff et al., 2006). Значения длин теломер для разных индивидуальных возрастов конкретного возраста лежат в достаточно широких пределах, и до сих пор не было обнаружено отчетливой корреляции между длиной теломер и временем обновления тканей *in vivo* (Takubo et al., 2002). Из-за многочисленных несоответствий литературных данных мы решили провести собственное исследование длины теломер в старших возрастных группах с целью выявления или опровержения зависимости скорости укорочения теломер хромосом при наличии патологии и прочих стрессовых воздействий. К тому же подобного рода исследования не проводились для изучения популяционных особенностей населения Северо-Запада России.

В исследуемую группу, состоящую из 170 человек (40 мужчин и 130 женщин), вошли пациенты С.-Петербургского городского геронтологического центра в возрасте от 55 до 101 года (средний возраст 79.98 ± 8.72 года). Все респонденты участвовали в исследовании добровольно. Анализ абсолютной длины теломер в лимфоцитарной фракции периферической крови проводился методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени по взятому из литературы оригинальному прото-

колу (O'Callaghan, 2008). Сопоставление результатов измерения длин теломер с данными анамнеза по материалам истории болезни и психологическими характеристиками проводилось факторным анализом, по результатам которого была получена корреляция средней длины теломер в лимфоцитах периферической крови с возрастом в самой старшей возрастной группе от 90 до 101 года, чего нельзя утверждать относительно всей исследуемой группы. Также отдельный фактор образовали длина теломер и пол, что подтверждает данные об ассоциации более коротких теломерных фрагментов с мужским полом. Однако не было обнаружено достоверной взаимосвязи длины теломер с патологическим, физиологическим и психологическим состоянием обследуемого. Вероятно, средняя длина теломер в лимфоцитах периферической крови не может служить надежным прогностическим маркером продолжительности жизни и начинает четко коррелировать с возрастом только в старших возрастных группах, когда длины теломер как бы суммируют все стрессорные воздействия, которым организм подвергался в течение жизни. Скорее можно ожидать, что продолжительность жизни связана не со средней длиной теломер в клетках организма, а в конкретных органах или тканях, способствуя развитию возрастных заболеваний (рак, инсульт, сердечная недостаточность), которые и служат наиболее распространенными причинами смерти в пожилом возрасте (Михельсон, Гамалей, 2010).

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

ДНК-ТРАНСПОЗОН MARINER КАК ИНСТРУМЕНТ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА.
© А. И. Соловьева, С. Ю. Демин, Н. К. Галактионов, О. И. Подгорная. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, orgcinuca@gmail.com.

Трематоды имеют сложный жизненный цикл, который протекает со сменой животных-хозяев и чередованием партеногенетических и гермафродитного поколений. Долгое время считалось, что особи партеногенетического поколения — редии и дочерние спороцисты, происходящие от одной материнской особи и обитающие в первом промежуточном хозяине (моллюске), равно как и производимые ими расселительные личинки — церкарии, представляют собой генетически идентичные клоны. Однако в последнее время появились полученные с использованием ДНК-маркеров данные, указывающие на существование индивидуальной изменчивости клонов дочерних спороцист, редий и их производных — церкарий. Это увеличивает генетическую вариабельность паразитов и соответственно шанс на успешную инвазию хозяина. Наиболее вероятными кандидатами на роль источника перестроек генома стали мобильные элементы, к которым относятся ДНК-транспозоны и ретропозоны. Модельный объект исследования — *Himasthla elongata* — относится к высокопатогенному семейству трематод, партеногенетические поколения живут в моллюске-хозяине *Littorina littorea*, которого относительно несложно содержать в аквариуме. Для *H. elongata* клонирован и охарактеризован транспозон семейства *Tc1/mariner* — *Hemar1* (Галактионов и др., 2009). Цель настоящей работы состоит в том,

чтобы определить, может ли *Hemar1* быть источником клональной изменчивости при поддержании генетического разнообразия партеногенетических поколений трематод. Для этого применяются 2 метода: 1) метод транспозон-дисплей (TID, Transposon Insertional Display), который используют для поиска генетического полиморфизма эукариот, опосредованного инсерциями транспозонов (Waugh et al., 1997); 2) метод флуоресцентной гибридизации in situ (FISH), для того чтобы обнаружить возможные кластеры *Hemar1* в разных геномах.

1. Метод транспозон-дисплей. Из отдельно взятого животного выделяли геномную ДНК. Учитывали моллюска-хозяина (А, В... etc.), редии из каждого моллюска (1, 2 ... N), церкарии из каждой редии ($\backslash 1, \backslash 2 \dots \backslash N$). ДНК обрабатывали рестриктазой *Hind III*, имеющей сайт внутри *Hemar1*, по сайтам рестрикции пришивали адаптеры и проводили ПЦР со специфическими к этим адаптерам праймерами. Результаты разделения ПЦР-продуктов в агарозном геле показали, что, во-первых, можно работать с ДНК, выделенной из одной церкарии; во-вторых, есть воспроизводимый полиморфный набор зон, характерный для тотальной ДНК, полученный на подобранных праймерах и адаптерах; в-третьих, наборы зон отдельных церкарий распадаются на 3 группы, каждая из которых характерна для одной редии. Планируется проведение клонирования полиморфных зон. Результаты секвенирования, вероятно, позволят утверждать, что именно *Hemar1* вовлечен в создание полиморфизма генома на уровне клональных популяций.

2. FISH. Для того чтобы картировать *Hemar1* в геноме, необходимо проведение цитогенетической работы, так как кариотип *H. elongata* не описан. Подобраны условия, позволяющие получить пригодные для гибридизации метафазные пластинки. Хромосомы различаются по размерам, типу строения и количеству содержания в них ДНК, что характерно для представителей семейства *Echinostomatidae*. По предварительным данным, кариотип содержит 24 пары хромосом. Из них 7—8 пар представлены микрохромосомами, которые «налипают» на более крупные. Более точную информацию о микрохромосомах кариотипа предполагается получить, проведя пульс-форез нативного хроматина.

ФОЛДИНГ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА sfGFP, ИМЕЮЩЕГО ТОПОЛОГИЮ БЕТА-БОЧОНКА. АНАЛИЗ ЯДРА СВРАЧИВАНИЯ.
© Олеся В. Степаненко, Ольга В. Степаненко, И. М. Кузнецова, К. К. Туроверов Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, lvs@mail.cytspb.rssi.ru.

Флуоресцентные белки (FPs) и их улучшенные мутантные формы широко используются в качестве внутриклеточных репортерных зондов, белковых меток и молекулярных биосенсоров в фундаментальных исследованиях процессов жизнедеятельности клетки и в медицине. Огромное разнообразие спектральных свойств FPs определяется в первую очередь химическим различием структур хромофора, который образуется из трех собственных аминокислот в положении 65—67 и находится внутри белковой глобулы. FPs являются типичными представителями белков с топологией типа бета-бочонка. Жесткая структура бета-бочонка защищает хромофор от воздействия среды и ограничивает его подвижность, тем самым предотвращая безызлучательную дезактивацию возбуж-

денного состояния хромофора. Взаимодействие хромофора с аминокислотами микроокружения оказывает влияние на спектральные свойства FPs. Синтез хромофора FPs становится возможным лишь после того, как сформирована нативная пространственная структура вокруг образующих хромофор аминокислот и правильным образом расположены аминокислоты, катализирующие и направляющие синтез хромофора. Поэтому изучение процессов сворачивания FPs представляет большой интерес. В данной работе изучались процессы разворачивания—сворачивания зеленого флуоресцентного белка sfGFP (super folder GFP) под действием гуанидинтиоцианата (GTC) с использованием абсорбционной спектроскопии, собственной флуоресценции и флуоресценции зеленого хромофора и гель-хроматографии. Преимуществами sfGFP являются его низкая склонность к агрегации и способность к рефолдингу. Было показано, что разрушение нативной структуры sfGFP при денатурации происходит в области концентраций GTC от 0.9 до 2.5 М и сопровождается синхронным изменением всех регистрируемых характеристик sfGFP. В области небольших концентраций денатуранта (менее 0.1—0.2 М) происходят локальные изменения структуры белка, о чем свидетельствуют результаты измерения параметра A , анизотропия флуоресценции и данные гель-фильтрации. Незначительные структурные перестройки, тем не менее, сопровождаются существенным изменением интенсивности флуоресценции хромофора и триптофанового остатка sfGFP. Также заметно изменяется полоса поглощения sfGFP в видимой области спектра: существенно падает интенсивность поглощения анионной формы хромофора и одновременно возрастает интенсивность поглощения нейтральной формы хромофора. Вероятно, эти эффекты обусловлены взаимодействием ионов денатуранта с группами белка. При изучении фолдинга белка ключевым моментом является изучение переходного состояния, т. е. определение аминокислот, взаимодействие между которыми происходит на ранних стадиях сворачивания белка и которые формируют ядро сворачивания. Для изучения ядра сворачивания sfGFP были созданы мутантные формы белка с заменами Val на Ala в положениях 22, 29, 55 и 68, ослабляющими гидрофобные взаимодействия. Было проведено изучение кинетики денатурации и ренатурации в широком диапазоне концентраций GTC, определены константы скоростей реакций и построены шевронные графики для мутантных форм sfGFP. Анализ шевронных графиков sfGFP и его мутантных форм показал, что остатки 22, 29 и 55 входят в ядро сворачивания.

АФФИННОСТЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЛЮКОЗЫ С D-ГАЛАКТОЗА/D-ГЛЮКОЗОСВЯЗЫВАЮЩИМ БЕЛКОМ И ЕГО МУТАНТНЫМИ ФОРМАМИ. © Ольга В. Степаненко, Олеся В. Степаненко, А. В. Фокин, И. М. Кузнецова, К. К. Туроверов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, sov@mail.cytspb.rssi.ru.

Белки, изменяющие свою конформацию при взаимодействии с аналитом, присутствие и концентрацию которого желательно определить в анализируемой среде, могут использоваться для конструирования биосенсорных систем. К таким белкам можно в первую очередь отнести лигандсвязывающие белки периплазмы бактерий. При связывании D-галактоза/D-глюкозосвязывающего белка (GGBP) из *E. coli* с глюкозой наблюдаются значительные

перестройки его пространственной структуры, что делает этот белок перспективным кандидатом на роль чувствительного элемента биосенсорной системы для непрерывного определения глюкозы в крови пациентов, больных диабетом. Константа диссоциации комплекса GGBP с сахаром очень низка (1 мкМ). Это означает, что белок дикого типа (GGBPwt) может быть использован в биосенсорной системе на глюкозу лишь в сочетании с трансдермальными методами экстракции сахара из крови или межклеточных жидкостей, сопряженными с существенным разбавлением глюкозы. Для использования GGBP в качестве чувствительного элемента биосенсорной системы на глюкозу для определения ее концентрации непосредственно в крови необходимо создать мутантную форму белка с существенно более низкой константой связывания глюкозы. При создании мутантных форм белков с заданными характеристиками следует учитывать, что введение мутации в первичную последовательность белка может привести к нарушению функциональной активности белка, его структуры и стабильности. В настоящей работе мы исследовали GGBPwt и его две мутантные формы, содержащие аминокислотные замены в активном центре, — GGBP-W183A и GGBP-F16A. Установлено, что оба белка сохраняют нативную глобулярную структуру, присущую GGBPwt, и способность связывать лиганд. Константа диссоциации обоих мутантных белков с глюкозой существенно выше, чем для GGBPwt. Чтобы охарактеризовать стабильность мутантных форм GGBP и GGBPwt, мы исследовали денатурацию этих белков под действием гуанидингидрохлорида (GdnHCl) и нагревания. Разворачивание GGBPwt, GGBP-W183A и GGBP-F16A под действием GdnHCl является обратимым одностадийным процессом. Денатурационный переход для мутантных форм GGBP сдвинут в область меньших концентраций денатуранта по сравнению с GGBPwt, что свидетельствует о дестабилизирующем влиянии замен W183A и F16A на структуру белка в целом. При этом мутантная форма GGBP-W183A более устойчива к действию GdnHCl, чем GGBP-F16A. При изучении тепловой денатурации белков был обнаружен более сложный характер их разворачивания. Замены W183A и F16A оказывают различное влияние на стабильность белка в целом. Показано, что N- и C-концевой домены GGBP-W183A имеют разную и более низкую стабильность по сравнению с белком GGBPwt. В присутствии глюкозы GGBP-W183A становится более стабильным к нагреванию. Белок GGBP-F16A обладает очень ограниченной стабильностью как в отсутствие, так и в присутствии лиганда. Это свидетельствует о том, что Phe 16 необходим для поддержания стабильности белка. На основании всех данных мы предполагаем, что GGBP-W183A является более перспективным белком в качестве чувствительного элемента биосенсора на глюкозу.

АКТИВАЦИЯ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ ATM/ATR ПРИ ДЕЙСТВИИ ДНК-ПОВРЕЖДАЮЩИХ АГЕНТОВ НЕ СОПРОВОЖДАЕТСЯ БЛОКОМ G₁/S КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ МЫШИ И ЧЕЛОВЕКА. © И. И. Суворова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, irsuvorov@yandex.ru.

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) имеют высокий пролиферативный потенциал и связанные с этим необычные свойства клеточного цикла — значительное

сокращение фазы G_1 и отсутствие G_1/S чекпойнта. Контрольные точки клеточного цикла играют важную роль в сохранении стабильности и целостности генома всех клеток. Так как ЭСК являются предшественниками всех типов клеток взрослого организма, любые нарушения в их геноме будут иметь катастрофические последствия. Однако то, каким образом ЭСК отслеживают и исправляют нарушения в ДНК на фоне быстрой пролиферации и в отсутствие G_1/S чекпойнта, не допускающего к репликации ДНК с повреждениями, остается до конца не выясненным.

В данной работе был исследован вклад ключевых киназ сигнального пути ATM/ATR в регуляцию клеточного цикла ЭСК человека и мыши. Было проанализировано влияние ингибиторов ATM/ATR, киназ Chk1, Chk2 (CGK733, 4-(2-Phenyl)-9-hydroxypyrrrolo[3,4-c]carbazole-1,3-(2H,6H)-dione, 2-(4-(4-Chlorophenoxy)phenyl)-1H-benzimidazole-5-carboxamide, Checkpoint Kinase Inhibitor IV соответственно) на распределение ЭСК по фазам клеточного цикла в норме и при действии генотоксических факторов. Показано, что в норме ингибирование активности этих киназ, за исключением ATM/ATR в ЭСК человека и Chk2 в ЭСК мыши, когда никаких эффектов не наблюдалось, приводило к накоплению клеток в фазе G_1 и уменьшению доли клеток в фазе S. После действия ДНК-повреждающих агентов (облучение, H_2O_2) ингибирование ATM/ATR, киназ Chk1, Chk2 значительно уменьшало количество клеток, находящихся в G_2/M , и увеличивало их долю в фазе G_1 без существенных влияний на фазу S. Однако исключение составляло ингибирование ATM/ATR и киназы Chk2 в ЭСК мыши, когда в первом случае происходило увеличение блока G_2/M , а во втором никаких изменений не наблюдалось. Мы также проанализировали влияние этих ингибиторов на выживаемость ЭСК мыши и показали, что кроме Chk2-ингибитора ингибиторы ATM/ATR и Chk1 значительно снижали жизнеспособность ЭСК мыши как в норме, так и после воздействия ДНК-повреждающих агентов. С помощью иммунофлуоресцентного окрашивания антителами к фосфорилированной форме киназы ATM по Ser-1981 было показано, что в ответ на повреждение ДНК происходят ее активация и накопление в ядре. Таким образом, несмотря на активное состояние сигнального пути ATM/ATR в ЭСК человека и мыши, в этих клетках отсутствует контрольная точка G_1/S . Мы исследовали активацию белка p53 и экспрессию его гена-мишени p21, белковый продукт которого прямо ингибирует cdk2 и опосредует остановку клеточного цикла в фазе G_1/S . Было показано, что в ответ на повреждение ДНК происходят активация (фосфорилирование) p53 и его локализация в ядре ЭСК человека и мыши. Но экспрессия p21 детектируется только на уровне мРНК, накопления же самого белка не происходит. Таким образом, ЭСК способны распознавать повреждение ДНК и запускать чекпойнт-ответ, однако самой остановки клеточного цикла не происходит, вероятно по причине дисфункции p53-p21^{Waf1} пути.

ПОТЕНЦИАЛНЕЗАВИСИМЫЕ НАТРИЕВЫЕ КАНАЛЫ: ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ. © А. В. Сударикова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, anastasia.sudarikova@gmail.com.

Транспорт ионов через плазматическую мембрану представляет собой необходимое условие жизнедеятельности всех клеток. В настоящее время сформировались

представления о семействах потенциалнезависимых ионных каналов клеточных мембран. Потенциалнезависимые натриевые каналы были обнаружены в транспортных эпителиях, а также в перитонеальных макрофагах, в гладкомышечных клетках, клетках карциномы A431, лимфомы U937 и лейкемии K562. В то же время молекулярная природа этих каналов до сих пор не установлена. Как возможные молекулярные корреляты могут рассматриваться каналы семейства DEG/ENaC (дегенирины/эпителиальные натриевые каналы). Главный критерий, доказывающий их принадлежность к этому семейству, — это ингибирование токов и каналов диуретиком амилоридом. В последнее время появились предположения о каналах ENaC, имеющих низкую чувствительность к амилориду. Судя по известным характеристикам, натриевые каналы в различных электронезависимых клетках, в том числе в клетках K562, близки к каналам семейства DEG/ENaC, за исключением блокирования амилоридом. Целью работы являлась молекулярная и функциональная идентификация потенциалнезависимых натриевых каналов в клетках миелоидной лейкемии человека K562 и лимфомы U937. Результаты ОТ-ПЦР-анализа показали, что в клетках K562 и U937 присутствуют α -, β - и γ -субъединицы hENaC. С помощью различных вариантов метода патч-кламп были изучены биофизические характеристики натриевых каналов. Проводимость одиночных каналов составляла около 12 пСм. В варианте регистрации токов whole-cell проверили действие амилорида на исследуемые каналы. Как в клетках K562, так и в U937 добавление амилорида (до 100 мкМ) в камеру не приводило к существенному изменению интегрального тока. На уровне одиночных каналов также не было выявлено изменений амплитуды и времен открытого и закрытого состояний при действии амилорида (outside-out и whole-cell). Таким образом, в клетках K562 и U937 показано отсутствие амилорид-чувствительной компоненты как на уровне одиночных каналов, так и на уровне интегрального натриевого тока. Наряду с фармакологическим подходом для функциональной идентификации каналов изучена их проницаемость для двухвалентных катионов. Установлено, что исследуемые каналы не проводят Ca^{2+} и Mg^{2+} в широком диапазоне концентраций (1—20 мМ). Как показано ранее и подтверждено в наших исследованиях, активация и инактивация натриевых каналов в клетках K562 контролируется процессами сборки-разборки примембранного цитоскелета. В наших экспериментах на изолированных фрагментах мембран клеток U937 (inside-out) обнаружена активация натриевых каналов (проводимость 11—13 пСм) при действии цитохалазина Д (10 мкг/мл). Добавление к цитоплазматической стороне мембраны глобулярного актина, который полимеризуется при повышении ионной силы раствора, приводило к инактивации каналов. Таким образом, полученные результаты демонстрируют, что в клетках миелоидной лейкемии K562 и лимфомы U937 функционируют потенциалнезависимые натриевые каналы, обладающие сходными характеристиками и механизмами регуляции. На основании электрофизиологических экспериментов и результатов ОТ-ПЦР-анализа можно сделать вывод о том, что амилорид-нечувствительные натриевые каналы в плазматической мембране клеток K562 и U937 принадлежат к семейству ENaC.

ВСТРАИВАНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО КРАСИТЕЛЯ ТИОФЛАВИНА Т В АМИЛОИДНЫЕ ФИБРИЛЛЫ: СТЕ-

ХИОМЕТРИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ И КОНСТАНТЫ СВЯЗЫВАНИЯ. © А. И. Сулацкая, И. М. Кузнецова, К. К. Туроверов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ansul@mail.ru.

Амилоидные фибриллы — особое компактное состояние белка, которому отвечает глубокий минимум свободной энергии, обусловленный межмолекулярными взаимодействиями макромолекул белка. Исследования последних лет показали, что подобные структуры при определенных условиях могут образовываться практически всеми белками. Несмотря на большое разнообразие амилоидогенных белков, различающихся по массе и структуре, архитектура всех амилоидных и амилоидоподобных фибрилл является сходной — они представляют собой пучки высокоупорядоченных обогащенных β -складчатыми структурами протеиновых нитей и могут достигать нескольких микрометров в длину и десятков нанометров в диаметре.

Долгое время считалось, что амилоидные фибриллы, полученные на основе разных белков, полностью идентичны. Однако за последние годы структуры нескольких амилоидоподобных фибрилл были расшифрованы с высоким разрешением и было показано их различие. Поскольку фибриллярное состояние белков является одним из основных термодинамически стабильных состояний белковой молекулы, изучение и сравнение их структуры в настоящее время является весьма актуальной задачей.

Известно, что флуоресцентный краситель тиреофлавин Т (ThT), который ранее использовался для диагностики возникновения амилоидных бляшек при ряде тяжелых заболеваний, таких как болезни Альцгеймера и Паркинсона, диабет второго рода, прионные заболевания и т. д., может быть инструментом для изучения структуры амилоидных фибрилл. Для этого в первую очередь необходимо охарактеризовать взаимодействие ThT с амилоидными фибриллами, определив параметры их связывания. Нами было показано, что флуоресцентный метод, применявшийся для этого ранее, в принципе не подходит для этих целей. Для изучения взаимодействия ThT с амилоидными фибриллами мы предлагаем использовать метод абсорбционной спектроскопии растворов, полученных методом равновесного микродиализа. Нами была разработана методика и составлены протоколы для определения числа мод связывания ThT с амилоидными фибриллами, констант связывания и числа мест связывания для каждой из мод, а также спектров поглощения и коэффициентов молярной экстинкции красителя, связанного с каждой из мод. Применимость предложенной методики продемонстрирована на амилоидных фибриллах, полученных на основе амилоидогенных белков инсулина, лизоцима и β -микроглобулина. Полученные результаты подтверждают предположения о том, что фибриллы, полученные на основе разных белков, различны, а предлагаемый нами подход может использоваться для сравнительного изучения их структуры.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы РАН «Молекулярная и клеточная биология», гранта правительства Санкт-Петербурга (ПСР № 10652), Фонда Дмитрия Зимина «Династия» и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-90038-Бел.).

ВЛИЯНИЕ ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ СЕРОТОНИНА НА КОГНИТИВНЫЙ ДЕФИЦИТ ПРИ НЕОНАТАЛЬНОМ ДИАБЕТЕ. © И. Б. Сухов, О. В. Чистякова, В. Н. Штилов, В. М. Бондарева, А. О. Шпаков. Институт эволюционной физиологии и биохимии им. акад. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, sukhov.ivan@gmail.com.

Сахарный диабет, являющийся одним из наиболее часто встречающихся метаболических расстройств у человека, ассоциирован с большим числом нейродегенеративных заболеваний. По нашим данным, а также данным других авторов, изменения в сигнальной системе мозга, регулируемой серотонином и другими нейротрансмиттерами, способствуют возникновению и развитию нейродегенеративных процессов при сахарном диабете. Однако активность аденилатциклазной (АЦ) системы и когнитивные функции при сахарном диабете 2-го типа (СД2), их взаимосвязь и влияние интраназального введения серотонина (ИВС) на функционирование мозга при СД2 исследованы мало. В этой работе мы исследовали влияние 8-недельного лечения на когнитивные функции у крыс с неонатальным СД2.

Неонатальный СД2 получали интерперитонеальным введением стрептозотоцина крысам линии Wistar в дозе 80 мг на 1 кг массы тела на 5-й день после рождения. Серотонин вводили интраназально начиная с 6 мес, контрольным и диабетическим животным в дозе 20 мкг на крысу. Когнитивные функции тестировались в пространственной версии водного теста Морриса в 2 серии по 5 дней.

Процесс обучения оценивали по длительности и динамике латентного периода поиска скрытой платформы. У диабетических крыс латентный период в первой серии был в 3.5, а во второй серии в 4—4.5 раза больше в сравнении с контролем, а динамика сокращения времени в поиске платформы была менее выраженной. ИВС не повлияло на длительность и динамику латентного периода у контрольных животных, но значительно улучшило процесс обучения у диабетических крыс. Так, у диабетических крыс с ИВС латентный период был достоверно меньше ($P < 0.05$) в сравнении с нелечеными животными как в первой, так и во второй сериях. Максимальный эффект лечения наблюдался в первый день второй серии: снижение латентного периода в 4 раза. В последний день тестирования в первой и второй сериях не было найдено достоверных различий в количестве пересечений аннулюса между нелечеными и лечеными серотонином контрольными животными. У диабетических животных без ИВС число пересечений аннулюса снижалось, а у леченых, напротив, достоверно увеличивалось как в первой, так и во второй сериях в среднем в 1.7 раза в сравнении с нелечеными животными. Парадоксально, что во второй серии количество пересечений аннулюса у диабетических крыс с ИВС было больше, чем в двух группах контрольных животных. Следовательно, можно сказать, что лечение диабетических крыс серотонином улучшает показатели долговременной пространственной памяти до соответствующих показателей у здоровых животных.

Таким образом, уменьшение времени поиска платформы и увеличение количества пересечений аннулюса у диабетических крыс с ИВС указывают на позитивное влияние серотонина на когнитивные функции у диабетических животных. Эти данные открывают новые возможно-

сти для лечения и профилактики нарушений, для улучшения обучения и памяти, нарушенных при СД2.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы «Фундаментальные науки — медицине» (2009—2011 гг.) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00746).

ИССЛЕДОВАНИЕ КАЛЬЦИЙПРОВОДЯЩИХ КАНАЛОВ В Т-КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ JURKAT. © В. Н. Томилин, С. Б. Семенова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, vntomilin@yandex.ru.

Ca^{2+} - и кальцийпроводящие ионные каналы играют важную роль в регуляции клеточных функций, экспрессии генов, в процессах пролиферации, дифференцировки, а также в злокачественной трансформации клеток. Например, различные митогенные факторы, контролирующие вход и прогрессию клетки в клеточном цикле, вызывают рост внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . Вход Ca^{2+} внутрь клетки осуществляется через каналы плазматической мембраны, идентификация которых в клетках крови до сих пор не завершена. В нашей работе с помощью метода локальной фиксации потенциала (метод patch-clamp, конфигурации inside-out, outside-out и whole-cell) исследовались кальциевые каналы клеток лимфоидной лейкемии человека (линия Jurkat). Зарегистрированные катионные каналы обладали свойством входящего выпрямления и проводимостью ~ 38 пСм. Активность каналов подавлялась рутениевым красным — ингибитором каналов TRPV5 и TRPV6.

Полученные результаты, а также литературные данные позволили предположить, что каналы в клетках Jurkat имеют характеристики высокоселективных Ca^{2+} -каналов TRPV5/TRPV6. Для подтверждения этой гипотезы были проведены эксперименты с иммуноцитохимическим окрашиванием клеток Jurkat и использованием антител против С-концевого участка белка TRPV5 и антител против С-концевого участка белка TRPV6. Иммуноцитохимический анализ показал присутствие флуоресцентно меченных белков TRPV5 и TRPV6 в плазматической мембране и цитоплазме клеток. Совокупность электрофизиологических и иммунологических данных позволяет заключить, что в клетках лимфоидной лейкемии линии Jurkat экспрессируются кальциевые каналы TRPV5/TRPV6.

РОЛЬ ПРОТЕАСОМ И ИХ СУБЪЕДИНИЦ α -ТИПА В ГИДРОЛИЗЕ РНК И СПЛАЙСИНГЕ. © О. А. Федорова, Т. Н. Мусеева. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, fedorovaolgand@mail.ru.

Протеасома — это мультикомпонентный белковый комплекс, главная задача которого состоит в направленной и специфической деструкции белков. Изучение роли протеасом в различных клеточных процессах приобретает все большую актуальность в связи с многочисленными экспериментальными данными об их участии в процессах раковой трансформации, старения и нейродегенерации. Белки разрушаются протеасомой как по убиквитинзависимому, так и по убиквитиннезависимому путям. Помимо протеолитических активностей протеасомы также обладают эндорибонуклеазной и геликазной активностью.

Имеются литературные данные и об ассоциации протеасом с некодирующей РНК. Недавние исследования показали, что ферментативные активности протеасом могут регулироваться за счет временных белок-белковых взаимодействий как с регуляторным 19S-комплексом, так и с коровым 20S-комплексом протеасомы. Для понимания роли протеасом в клеточных процессах, ассоциированных с метаболизмом РНК, представляют особый интерес определение спектра белков, связывающихся с коровым 20S-комплексом протеасомы, а также изучение их непосредственного влияния на эти процессы.

Для изучения РНКазной активности протеасомных субъединиц были получены экспрессионные векторы pGEX-5X-1- $\alpha 1$, 2, 3, 4, 5 и 7, несущие гены, кодирующие соответствующие субъединицы $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ и $\alpha 7$. Гены были помещены в открытые рамки считывания фермента глутатион-S-трансферазы (GST) так, что синтезируемые белки представляли собой белки слияния функционально активной GST и аминокислотной последовательности субъединиц. Были подобраны оптимальные условия экспрессии этих белков. Очистка химерных белков осуществлялась методом аффинной хроматографии. Для исследования РНКазной активности очищенных субъединиц в качестве субстратов использовали транскрибированные *in vitro* мРНК *p53* и 3'-нетранслируемую область мРНК *c-myc*. Эксперименты показали, что все аффинноочищенные из *E. coli* субъединицы α -типа обладали РНКазной активностью, кроме белка GST самого по себе. Эндорибонуклеазная активность субъединиц зависела от используемого субстрата и присутствия в реакционной смеси двухвалентных катионов. Для понимания роли протеасом в клеточных процессах, ассоциированных с метаболизмом РНК, представляло интерес определить спектр белков, связывающихся с коровым 20S-комплексом протеасомы. Из литературных данных известно, что с субъединицей $\alpha 7$ корового комплекса связывается целый ряд белков, многие из которых затем деградируют по убиквитиннезависимому механизму. С помощью метода GST pulldown нами было показано, что белки, ассоциированные с субъединицей $\alpha 7$, участвуют в различных клеточных процессах, таких как транскрипция, сплайсинг, репарация ДНК, метаболизм и трансляция. Кроме того, были обнаружены белки цитоскелета и шапероны, взаимодействующие с $\alpha 7$. Впервые удалось показать, что ряд взаимодействующих белков участвует в сплайсинге. Кроме того, эксперименты показали, что протеасома непосредственно участвует в регуляции альтернативного сплайсинга *in vitro* с использованием матрицы, представляющей собой фрагмент гена SMN1/2. Как 20S-коровый комплекс, так и 19S-регуляторная частица влияют на альтернативный сплайсинг гена SMN1, мутации в котором приводят к мышечной дистрофии. При этом протеолитические активности 20S-коровой частицы не нужны для эффективного подавления сплайсинга.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-01234) и программы Министерства образования и науки РФ (Госконтракт 16.740.11.0366).

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ИНГИБИТОРОВ ГИСТО-НОВЫХ ДЕАЦЕТИЛАЗ НА ФУНКЦИИ БЕЛКА GADD45 α .

© Е. А. Филиппова, О. О. Гнедина, М. В. Абрамова, С. Б. Светликова, В. А. Поспелов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, mav_2004@mail.ru.

Ингибиторы гистоновых деацетилаз (HDACi) способствуют ацетилированию гистонов, что приводит к деконденсации хроматина и активации транскрипции ряда генов, вовлеченных в регуляцию клеточного цикла, дифференцировку, апоптоз и иммунный ответ. Последние данные свидетельствуют о том, что HDACi могут модулировать сигнальные пути, контролируемые ответ клетки на действие ДНК-повреждающих агентов и различных стресс-факторов, тем самым повышая чувствительность клетки к действию цитостатиков. Поэтому весьма перспективным представляется комбинированное использование HDACi и различных ДНК-повреждающих агентов для более эффективного подавления развития опухолей или индукции в них апоптоза. Однако точные механизмы действия HDACi остаются невыясненными. Gadd45 α известен как белок, индуцируемый различными ДНК-повреждающими агентами и стрессами, которые сопровождаются блоком пролиферации. Gadd45 принимает участие в регуляции многих клеточных процессов, включая пролиферацию, репарацию ДНК, контроль клеточного цикла и апоптоз, за счет взаимодействия с различными белками, включая p21/Waf1, PCNA, комплекс циклин В/CDK2 и др.

Учитывая данные о роли белков Gadd45 в клеточном старении, мы исследовали влияние ингибиторов HDAC на экспрессию Gadd45 α в онкогенотрансформированных фибробластах E1A+Ras. Методом иммуноблоттинга мы показали, что при действии ингибитора HDAC бутирата натрия происходит изменение способности димеризации белка Gadd45 α . Так, снижается количество гомодимеров, сопровождающееся накоплением мономерной формы белка Gadd45 α . Известно, что олигомерная форма Gadd45 α принимает участие в регуляции доступности ДНК в участке поврежденного хроматина. Кроме того, олигомеризация Gadd45 α приводит к изменению набора белков-партнеров, способных к взаимодействию с Gadd45 α . Следовательно, клеточные взаимодействия Gadd45 α могут регулироваться статусом его олигомеризации. Как следствие индуцированного бутиратом натрия перераспределения форм белка Gadd45 α мы обнаружили снижение способности Gadd45 α образовывать комплекс с киназой ATM, при этом наблюдали усиление способности связываться с MAP-киназой p38. Методом иммунопреципитации с последующим иммуноблоттингом мы обнаружили накопление Gadd45 α в комплексе с фосфорилированным гистоном H2AX (γ H2AX), что указывает на роль Gadd45 α в формировании индуцированных ингибиторами HDAC фокусов репарации ДНК, маркированных фокусами γ H2AX, показанных нами ранее. Роль белков семейства Gadd45 в репарации определяется главным образом их способностью взаимодействовать и, таким образом, изменять активность PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen). Gadd45 влияет также на активность PCNA, конкурентно взаимодействуя с белком p21/Waf1, который в не связанной с Gadd45 α форме подавляет способность PCNA взаимодействовать с ДНК-полимеразой. Методом иммунопреципитации с последующим иммуноблоттингом мы показали, что при действии бутирата натрия параллельно с накоплением мономерной формы белка Gadd45 α наблюдается снижение способности p21/Waf1 взаимодействовать с PCNA.

ДИНАМИКА ОБРАЗОВАНИЯ И ЭЛИМИНАЦИИ ГИСТОНА γ -H2AX В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПОСЛЕ РЕНТГЕНОВСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ. © Д. В. Фирсанов, А. В. Кропотов, В. М. Михайлов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, dfirsanov@gmail.com.

Двухнитевые разрывы (ДР) ДНК являются наиболее опасными повреждениями генома, вызванными ионизирующей радиацией, химическими агентами и действием лазеров. Неправильная репарация ДР вызывает хромосомные aberrации в митозе и потенциально может приводить к развитию рака. В конце XX в. было выяснено, что одним из ранних этапов ответа клетки на возникновение ДР ДНК после ионизирующего облучения является фосфорилирование гистона H2AX по серину 139 с образованием фокусов γ -H2AX. Фокусы γ -H2AX обнаруживаются в клетках уже в первые минуты после ионизирующего облучения, затем происходит медленная элиминация этих фокусов, коррелирующая с динамикой воссоединения ДР ДНК.

На модели культивируемых эмбриональных фибробластов человека (ЭФЧ) мы показали, что максимум количества фокусов γ -H2AX наблюдается через 1 ч после рентгеновского облучения в дозе 2 Гр, затем происходит их медленная элиминация, и через 24 ч после воздействия наблюдаются клетки с остаточными фокусами, что может говорить о незавершенности репарации ДР. Представлялось интересным исследовать динамику образования и элиминации γ -H2AX в клетках, соседствующих с облученными клетками, при экранировании необлученных клеток свинцом. Так называемый эффект свидетеля наблюдался уже через 1 ч после рентгеновского облучения ЭФЧ в дозе 2 Гр, где среднее число фокусов γ -H2AX примерно в 4 раза превышало контрольные значения. Через 24 ч после облучения среднее число фокусов γ -H2AX в клетках-свидетелях доходило до контрольного уровня. Таким образом, в условиях наших экспериментов «эффект свидетеля» полностью элиминировался через 24 ч после воздействия.

Ранее мы показали, что в кардиомиоцитах сердца мышцей по сравнению с эпителием почечных канальцев наблюдается задержанная элиминация γ -H2AX, и большой процент клеток окрашивается антителами на γ -H2AX через 23 ч после рентгеновского облучения в дозе 3 Гр. Используя в качестве модельной системы сирийского хомячка (*Mesocricetus auratus*), мы также обнаружили в клетках сердца остаточные фокусы γ -H2AX через 24 ч после рентгеновского облучения в дозе 5 Гр. Однако нам не удалось обнаружить сколько-либо значимых различий в эффективности элиминации γ -H2AX в мозге и печени хомячков после облучения в дозе 5 Гр. Несмотря на то что кинетика элиминации γ -H2AX в этих органах была различна, через 24 ч после воздействия число γ -H2AX-положительных ядер было сопоставимо с контрольными значениями.

Для уточнения наших данных, полученных на органах мыши методом иммуногистохимии, мы исследовали методом иммуноблоттинга динамику образования γ -H2AX в сердце, печени и почке после рентгеновского облучения животных в дозе 3 Гр. Через 20 мин после облучения в сердце наблюдался более низкий уровень сигнала γ -H2AX, чем в печени и почке. Различия в уровне сигнала γ -H2AX между тканями можно было бы объяснить различными уровнями экспрессии генов H2AX и киназ ATM и DNA-PK, ответственных за фосфорилирование H2AX.

Однако с помощью методики ПЦР в реальном времени нам не удалось обнаружить различия в экспрессии этих генов, коррелирующих с нашими данными.

Таким образом, вопросы об эффективности образования и элиминации γ -H2AX в клетках млекопитающих на данный момент все еще остаются открытыми, и требуются дополнительные исследования для понимания этих процессов.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СОЛЬВАТОХРОМНОГО КРАСИТЕЛЯ BADAN В БИОСЕНСОРНЫХ СИСТЕМАХ НА ГЛЮКОЗУ. © А. В. Фонин, Ольга В. Степаненко, И. М. Кузнецова, К. К. Туроверов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, alexfonin@gmail.com.

Необходимым условием нормального функционирования любой сенсорной системы является наличие сигнала, достаточно устойчивого к флуктуациям характеристик внешней среды. В разрабатываемой нами биосенсорной системе на глюкозу в качестве чувствительного элемента используется мутантная форма D-глюкоза/D-галактозосвязывающего белка GGBP/H152C с присоединенным флуоресцентным красителем BADAN. Регистрация взаимодействия чувствительного элемента биосенсора с глюкозой осуществляется путем измерения интенсивности флуоресценции красителя. Известно, что при взаимодействии GGBP/H152C-BADAN с глюкозой наблюдается трехкратное усиление интенсивности флуоресценции красителя. Этот эффект обусловлен тем, что при образовании комплекса белок/глюкоза BADAN оказывается в существенно более гидрофобном окружении по сравнению с окружением красителя до взаимодействия GGBP/H152C-BADAN с глюкозой. BADAN является сольватохромным красителем, и его характеристики зависят от свойств микроокружения зонда. Поэтому необходимо изучать влияние флуктуаций параметров среды не только на структуру белка, но и на флуоресцентные свойства свободного красителя.

Выполнено исследование физико-химических свойств GGBP/H152C-BADAN как в открытой, так и в закрытой формах, стабильности GGBP/H152C-BADAN и GGBP/H152C-BADAN/Glc, влияния pH среды на флуоресцентные свойства BADAN как в свободном, так и в связанном с белком состояниях. Исследована динамика взаимодействия GGBP/H152C-BADAN с глюкозой. Показано, что мутантная форма GGBP/H152C-BADAN обладает высоким сродством к глюкозе. Кинетика связывания глюкозы с белком незначительно зависит от вязкости среды. Показано, что мутантная форма GGBP/H152C обладает достаточно высокой стабильностью, позволяющей использовать ее в качестве чувствительного элемента биосенсорной системы. Флуоресцентный краситель BADAN высокочувствителен к своему микроокружению и может быть использован при детектировании взаимодействия глюкозы с чувствительным элементом глюкометра. Флуоресцентные характеристики BADAN мало подвержены действию изменений параметров среды в предполагаемых условиях работы биосенсорной системы на глюкозу. На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что мутантная форма D-глюкоза/D-галактозосвязывающего белка GGBP/H152C с присоединенным красителем BADAN может служить чувствительным элементом биосенсорной системы на глюкозу.

ИЗМЕНЕНИЕ СВОЙСТВ АКТИНА, РАСЩЕПЛЕННОГО ПРОТЕАЛИЗИНОМ, ПОД ДЕЙСТВИЕМ ФТОРИДОВ АЛЮМИНИЯ И НАТРИЯ. © О. А. Цаплина, С. Ю. Хайтлина. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, olga566@mail.ru.

Мы впервые показали, что условно-патогенные бактерии *Serratia proteamaculans*, синтезирующие актин-специфическую металлопротеазу протеализин, способны проникать в клетки эукариот. После трансформации плазмидной ДНК, содержащей ген протеализина, способность к проникновению в клетки эукариот (инвазии) приобретают неинвазивные бактерии *E. coli*. При инвазии бактерий, синтезирующих протеализин, фермент попадает как во внеклеточную среду, так и внутрь клеток эукариот. Однако добавление протеализина во внеклеточную среду не приводит к проникновению неинвазивных бактерий *E. coli* внутрь клеток эукариот. Эти данные позволяют предположить, что протеализин способствует инвазии бактерий, оказавшись внутри эукариотической клетки. Наиболее вероятной мишенью для внутриклеточного действия протеализина является актин, так как он специфически расщепляется протеализином. При весовом соотношении фермент/G-актин, не превышающем 1 : 100, протеализин расщепляет в актине единственную пептидную связь Gly42-Val43, расположенную в ДНКазной петле, а при увеличении концентрации фермента дополнительно расщепляются связи Gly63-Ile64 и Thr66-Ile67 в нуклеотидной щели молекулы. Расщепленный G-актин теряет способность к полимеризации, которая частично восстанавливается после замены ионов Ca^{2+} на ионы Mg^{2+} . F-актин, состоящий из расщепленных протеализином субъединиц, обладает высокой АТФазной активностью (до 4 моль Pi/моль актлина/ч), что отражает значительное усиление динамики полимера по сравнению с нерасщепленным актином (0.04 моль Pi/моль актлина/ч). Однако кортикальный цитоскелет, который может быть вовлечен в проникновение бактерий в клетку-хозяина, состоит в основном из менее доступного для протеолиза фибриллярного актлина. За время, примерно соответствующее времени проникновения бактерий в клетки, протеализин расщепляет от 20 до 40 % F-актина. Расщепление уменьшает степень полимеризации F-актина и способность к осаждению при ультрацентрифугировании. АТФазная активность F-актина, на 40 % расщепленного протеализином, повышалась до 1.6 моль Pi/моль актлина/ч. Таким образом, расщепление протеализином и глобулярного, и фибриллярного актлина сдвигает равновесие между его G- и F-формами. Чтобы выяснить, как влияют на это равновесие факторы, стабилизирующие актин, в модельных экспериментах актин стабилизировали ионами AlF_4 , препятствующими образованию АДФ-актина. В AlF_4 -F-актине, состоящем из расщепленных протеализином мономеров, обмен субъединиц прекращается. Кроме того, ионы AlF_4 способствуют полимеризации расщепленного G-актина. Оказалось, что NaF, который в экспериментах на клетках используют как активатор малых ГТФаз и ингибитор фосфатаз, также уменьшает лаг-фазу кривой полимеризации расщепленного Mg-G-актина и ускоряет полимеризацию примерно в 7 раз. Предварительная инкубация как G-актина, так и F-актина с фторидами ингибирует расщепление актлина протеализином. Следовательно, факторы, стабилизирующие актин, могут сдвигать равновесие между G- и F-формами в направлении, обратном действию протеализина. Таким образом, после транслокации в клетки

эукариот протеализин и факторы, стабилизирующие актин, могут совместно регулировать перестройки актинового цитоскелета, необходимые для инвазии бактерий.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ И МОДЕЛИРОВАНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК ДУПЛИКАЦИИ ГЕНОМА В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ. © В. О. Чагин. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, dr.chagin@mail.ru.

Процесс удвоения генома является центральным процессом при пролиферации клеток. Любые ошибки при репликации ДНК могут приводить к мутациям и хромосомным аномалиям. При этом программа репликации ДНК в клетках высших эукариот обладает способностью к динамичной и гибкой регуляции как на уровне отдельных клеток, так и на уровне популяций клеток и организмов, а также в ходе процессов дифференцировки и развития.

Геном большинства млекопитающих содержит порядка 10^9 пар нуклеотидов (п. н.), что составляет около 100 см линейной длины ДНК. Гаплоидный геном человека содержит 23 хромосомы и имеет размер $3.2\text{—}4.15 \cdot 10^9$ п. н. (Gregory, 2001). Репликация осуществляется во время S-фазы клеточного цикла, длительность которой у большинства теплокровных млекопитающих, за исключением клеток ранних эмбрионов, составляет 6—10 ч (Liarpova, 1994). Было обнаружено, что хромосомы эукариот реплицируются не как единое целое, а по частям, синтез которых привязан к определенным моментам S-фазы (Taylor, 1960), причем синтез идет параллельно во многих участках хромосом. Соответственно был сделан вывод о том, что каждой хромосоме эукариот соответствуют многочисленные элементарные единицы репликации, которые по аналогии с бактериальными системами были названы репликаонами (Jacob, Brenner, 1963).

Несмотря на то что объем знаний по различным аспектам процесса удвоения генома постоянно увеличивается, до сих пор остается ряд вопросов, на которые не получено однозначных ответов. В частности, существуют противоречивые данные о размере и времени жизни репликаонов. Мало известно о пространственно-временной организации процесса репликации ДНК в рамках S-фазы клеточного цикла: существуют различные оценки времени жизни единиц репликации, абсолютной продолжительности различных периодов, соответствующих различным картинам репликации, синхронности инициации отдельных репликаонов или групп репликаонов и количеству ДНК, которая реплицируется в определенные периоды S-фазы. Кроме этого, не существует общепринятой количественной модели репликации ДНК в клетках млекопитающих.

В докладе будут представлены подходы к определению количественных параметров репликации ДНК и прохождения клетками млекопитающих (культивируемыми клетками человека и мыши) клеточного цикла. Также будет рассмотрено использование указанных параметров при моделировании удвоения генома.

FRET-АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ГЛИКОГЕНА В ГЕПАТОЦИТАХ КРЫС. © А. Ю. Честнова, Н. Н. Безбородкина, Г. И. Штейн. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, chestnovaanna@mail.ru.

Гликоген — сверхразветвленный полимер глюкозы — является одним из ключевых резервов энергии для животных (включая человека). Предполагают, что структура молекул гликогена играет не последнюю роль в его метаболизме. Установлено, что синтез и распад молекул гликогена при смене пищевого статуса организма сопровождаются изменениями их пространственной структуры. Однако конкретные механизмы таких изменений неизвестны.

В связи с этим с помощью цитохимического и FRET (Förster Resonance Energy Transfer) методов исследовали структуру молекул гликогена в гепатоцитах крыс при голодании и через разные интервалы времени после введения животным глюкозы *per os*. Гепатоциты на предметных стеклах окрашивали с использованием флуоресцентного варианта PAS-реакции. Окраска препаратов в течение 40 мин бромистым этидием-SO₂ (EtBr-SO₂) выявляла легкодоступную (ЛД) фракцию (красная флуоресценция, $\lambda_{\max} \approx 610$ нм), а их последующая окраска аурамин-ом-SO₂ (Au-SO₂) в течение 50 мин — труднодоступную (ТД) фракцию гликогена (зеленая флуоресценция, $\lambda_{\max} \approx 530$ нм) в клетках. Общее содержание гликогена (ЛД и ТД) в гепатоцитах на разных этапах рефидинга крыс определяли с помощью цитофлуориметра, а затем в тех же клетках измеряли эффективность FRET. Регистрацию FRET в нескольких участках клеток (обычно 3—4 участка) производили с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP5, используя процедуру FRET AB (Acceptor Photobleaching). В качестве донора (D) использовали аурамин, а акцептора (A) — бромистый этидий. Максимум флуоресценции клеток, окрашенных Au-SO₂, близок к максимуму поглощения клеток, окрашенных EtBr-SO₂, что является основным условием FRET.

Изменение расстояния между акцептором и донором в молекулах гликогена оценивали по эффективности FRET, % (E). При определении эффективности FRET использовали объектив HCX PL APO 40×/1.25Oil и два лазера — 405 (возбуждение донора) и 514 (фотообесцвечивание акцептора) нм. Проведенное нами исследование показало, что эффективность FRET в гепатоцитах на разных этапах после введения крысам глюкозы значительно варьирует и в среднем составляет 10—14 %, при этом структура гликогена оказывает заметное влияние на величину этого показателя. Показано, что в клетках голодных крыс и на ранних сроках после введения животным глюкозы эффективность FRET коррелирует с величиной отношения A/D, которая отражает степень заполнения внешних ярусов молекул гликогена остатками глюкозы. Однако по мере накопления гликогена в клетках зависимость эффективности FRET от величины отношения A/D либо становилась менее выраженной, либо исчезала. Установлено, что при одном и том же значении A/D эффективность FRET может изменяться в 3—4 раза. Поскольку вероятность передачи энергии от D к A пропорциональна $1/R^6$, где R — расстояние между D и A, такие колебания эффективности FRET означают, что молекулы гликогена обладают лабильной структурой, в которой цепи гликозидных остатков могут отклоняться от своей оси на расстояние около половины их диаметра.

УЧАСТИЕ МЕМБРАННОГО ХОЛЕСТЕРИНА И РАФТОВ В РЕГУЛЯЦИИ МЕХАНОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КАНАЛОВ И АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА.

© В. И. Чубинский-Надеждин. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, vchubinskiy@gmail.com.

Ионные каналы, реагирующие на изменение механического состояния мембраны, широко распространены в живой природе и играют важную роль в процессах клеточной сигнализации и транспорта. Один из центральных вопросов регуляции механочувствительных каналов, активирующихся в ответ на растяжение (stretch) плазматической мембраны в клетках эукариот, — вклад липидного бислоя и актинового цитоскелета. В нашей работе с помощью метода локальной фиксации потенциала (patch-clamp, конфигурация cell-attached) обнаружено подавление активности механочувствительных (МЧ) каналов в клетках миелоидной лейкемии человека линии K562 после экстракции холестерина метил-бета-циклодекстрином (МБЦД), в то время как альфа-циклодекстрин (структурный аналог, не связывающий стеролы) не влиял на характеристики каналов. Обнаруженные изменения параметров активации МЧ-каналов свидетельствовали об увеличении жесткости плазматической мембраны при экстракции холестерина, что не соответствует классическим представлениям о зависимости физических свойств бислоя от содержания стеролов. Мы проанализировали эффекты МБЦД, основываясь на концепции липидных рафтов — обогащенных холестерином (cholesterol-enriched) микродоменов клеточной мембраны. Флуоресцентное мечение маркерного компонента рафтов ганглиозида GM1 при помощи FITC-конъюгированной бета-субъединицы холерного токсина (FITC-СТВ) свидетельствовало об изменениях клеточной поверхности и структуры микродоменов после действия МБЦД. С помощью конфокальной микроскопии выявлены перестройки F-актина и разрастание актиновой сети в клетках, обработанных МБЦД, которое, возможно, обусловлено сборкой филаментов на базе пула имеющегося в клетках глобулярного актина. Обнаружено, что обработка клеток K562 с пониженным содержанием холестерина при помощи модификаторов цитоскелета цитохалазина D или латрункулина B приводит к восстановлению активности МЧ-каналов. Таким образом, было показано, что ингибирование МЧ-каналов в клетках K562 после снижения уровня мембранного холестерина было вызвано перестройками актиновой сети микрофиламентов и повышением жесткости комплекса плазматическая мембрана-цитоскелет. Наши результаты позволяют полагать, что липидные рафты и мембранный холестерин могут регулировать клеточную механочувствительность через перестройки актинового цитоскелета, которые опосредованы деструкцией богатых холестерином мембранных микродоменов.

ЭФФЕКТ ДИПОЛЬНЫХ МОДИФИКАТОРОВ НА СТАЦИОНАРНЫЙ ТРАНСМЕМБРАННЫЙ ТОК, ИНДУЦИРОВАННЫЙ ПОЛИЕНОВЫМ АНТИМИКОТИКОМ НИСТАТИНОМ, В СОДЕРЖАЩИХ ЭРГОСТЕРИН БИСЛОЯХ. © Е. Г. Чулков, С. С. Ефимова, О. С. Остроумова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ostroumova@mail.cytspb.rssi.ru.

Фунгицидные свойства полиенового противогрибкового антибиотика нистатина обусловлены его взаимодействием с мембранами грибковых клеток, приводящим к образованию в них ионных каналов, нарушению водно-электролитного баланса и последующей гибели клет-

ки. Необходимым условием возникновения нистатиновых каналов является наличие в мембране стерина, в частности эргостерина, в грибковых клетках и холестерина в клетках млекопитающих. В настоящей работе были проведены исследования каналообразующей активности нистатина в плоских липидных бислоях, содержащих 67 М% дифитаноилфосфатидилхолина и 33 М% эргостерина, в присутствии дипольных модификаторов флоретина и RH 421 (агентов, способных изменять величину дипольного потенциала мембраны). Количественной мерой эффективности действия нистатина был принят стационарный ток, протекающий через модифицированную полиеном мембрану. Введение в раствор, омывающий содержащую эргостерин мембрану, 20 мкМ флоретина, уменьшающего дипольный потенциал бислоя на 150 мВ, приводило к росту стационарного тока в 3—10 раз. Введение 5 мкМ RH 421, увеличивающего дипольный потенциал мембраны более чем на 60 мВ, практически не влияло на стационарный трансмембранный ток.

Обсуждаются возможные механизмы наблюдаемых явлений: опосредован ли эффект флоретина изменением дипольного потенциала бислоя при его введении или он является результатом непосредственного взаимодействия этого дипольного модификатора с нистатин-эргостериновыми комплексами?

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00883), программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и грантов президента РФ (НШ 3796.2010.4 и МК-1813.2012.4).

РОЛЬ КОРТИКОСТЕРОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ВЕНТРАЛЬНОГО ГИППОКАМПА В РЕАЛИЗАЦИИ ПРОАДАПТИВНЫХ ЭФФЕКТОВ ГИПОКСИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ. © А. В. Чурилова, М. О. Самойлов. Институт физиологии им. акад. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, annch05@mail.ru.

Согласно современным представлениям, глюко- (ГР) и минералокортикоидным (МР) рецепторам вентрального гиппокампа принадлежит важная роль в регуляции гипоталамо-гипофизарно-адренортикаральной системы (ГГАС), которая является основной стресс-системой организма. Активация МР в вентральном гиппокампе (зубчатая извилина) индуцирует тоническое ингибирование активности ГГАС, а активация ГР запускает механизмы обратной отрицательной связи (торможения ГГАС). Таким образом, нарушение МР/ГР-баланса в вентральном гиппокампе может являться одной из причин нарушения нейроэндокринной регуляции. В работе исследовалось влияние гипобарической гипоксии, которая в зависимости от режима ее предъявления оказывает как дезинтеграционное, так и проадаптивное влияние на экспрессию ГР и МР в зубчатой извилине гиппокампа. Условия тяжелой гипоксии (ТГ, 180 мм рт. ст., 3 ч) и прекондиционирования (1- и 3-кратное ПК, 360 мм рт. ст., 2 ч; в случае 3-кратного ПК интервал между сеансами составлял 24 ч) создавали в барокамере. Уровень экспрессии ГР и МР выявляли иммуноцитохимическим методом, после чего количественно оценивали его с помощью компьютерной программы «Видео-Тест Мастер Морфологии». ТГ у непрекондиционированных животных приводила к нарушению нормальной (двухфазной, состоящей из активации и инактивации)

реакции ГГАС. Вместе с тем ТГ сопровождалась глубоким подавлением экспрессии МР при неизменном уровне ГР относительно контроля. Схожая картина наблюдалась и в случае однократно прекондиционированной ТГ, не обладающей проадаптивным действием. В отличие от этого у животных, которым предъявлялось 3-кратное ПК, при котором наблюдалась нормальная двухфазная реакция ГГАС в ответ на ТГ, значительно увеличивалась экспрессия ГР, а уровень МР оставался близким к контрольным значениям. Интерес представляют данные о том, что само по себе 3-кратное ПК-воздействие значительно усиливает экспрессию как МР, так и ГР, тогда как однократное ПК-воздействие не оказывает такого эффекта. Таким образом, результаты исследования показывают, что ГР и МР вентрального гиппокампа вовлекаются в механизмы обратной отрицательной связи ГГАС, которые нарушаются действием ТГ у непрекондиционированных крыс и которые можно предотвратить предварительным воздействием умеренной гипобарической гипоксией. Важное значение в этих процессах имеет режим ПК.

КАНАЛЫ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ КЛЕТОК ЛИНИИ НЕК 293, РЕГУЛИРУЕМЫЕ БЕЛКАМИ STIM 2 — КАЛЬЦИЕВЫМИ СЕНСОРАМИ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА. © А. В. Шалыгин, Е. В. Казначеева. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, a_shalygin@mail.ru.

Ионы кальция — важнейший внутриклеточный посредник. Кальций может запасаться во внутриклеточных депо, например в эндоплазматическом ретикулуме. Белок Stim — это кальциевый сенсор эндоплазматического ретикулума. При опустошении кальциевого депо белок Stim гомоолигомеризуется и активирует кальциевые каналы плазматической мембраны для перезарядки депо. У млекопитающих есть две изоформы белков Stim, которые различаются чувствительностью к концентрации кальция. Белки Stim 1 активируют вход кальция в ответ на большие изменения концентрации кальция, тогда как Stim 2 активируется даже небольшими изменениями кальция в депо. В электронеозбудимых клетках часто присутствует несколько различных типов кальциевых каналов. Вход кальция, активируемый белками Stim 2, мало изучен. Неизвестно, какие типы кальциевых каналов помимо каналов CRAC активируются белками Stim 2.

Методом иммуноблоттинга мы продемонстрировали, что клетки НЕК 293 конститутивно экспрессируют белок Stim 2. Чтобы определить, какие типы кальциевых каналов клеток НЕК 293 регулируются белками Stim 2, мы использовали два подхода. Первый — это специфическая активация нативных белков Stim 2 при опустошении депо тапсигаргином в концентрации 10 нМ. Второй — это оверэкспрессия белков Stim 2 в клетках НЕК 293. В обоих случаях регистрацию токов через кальциевые каналы плазматической мембраны осуществляли методом локальной фиксации потенциала в конфигурации cell-attached. 10 нМ тапсигаргина активировало белки Stim 2, что индуцировало кальциевые каналы I_{min} в 60 % экспериментов. Оверэкспрессия белков Stim 2 приводила к увеличению вероятности активации каналов I_{min} при обработке клеток тапсигаргином. Можно предположить, что белок Stim 2 может участвовать в регуляции кальциевых каналов I_{min} плазматической мембраны клеток НЕК 293.

Работа выполнена при финансовой поддержке ГК 14.740.11.0924 и ГК П332, программы РАН «Молекулярная и клеточная биология», Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 11-04-12047, 10-04-01002 и 10-04-00956), гранта президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-3796.2010.4) и грантом правительства г. Санкт-Петербурга для молодых кандидатов наук.

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА ШАПЕРОНА HSP70 В МОДЕЛИ ИНТРАКРАНИАЛЬНОЙ ГЛИОБЛАСТОМЫ КРЫС. © М. А. Шевцов,^{1,2} В. А. Хачатрян,² А. В. Поздняков,³ И. В. Романова,⁴ И. В. Гужова,¹ Б. А. Маргулис.¹ ¹Институт цитологии РАН, ²Российский научно-исследовательский нейрохирургический институт им. проф. А. Л. Поленова, ³ГУЗ «С.-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи» и ⁴Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Shevtsov-max@mail.ru.

Белки теплового шока, в особенности шаперон Hsp70, играют важную роль в активации врожденного и приобретенного противоопухолевого иммунного ответа. В экспериментах *in vitro* на различных клеточных линиях (клетки эритроидной лейкемии человека K562, меланомы B16 и крысиной глиомы C6) мы продемонстрировали с помощью метода конфокальной микроскопии, что белок, внесенный в клеточную культуру, способен проникать внутрь клеток, при этом собственный (эндогенный) Hsp70, вытесняется на поверхность раковых клеток. При добавлении клеток, предварительно проинкубированных с шапероном Hsp70, к суспензии спленоцитов наблюдалось повышение литической активности последних на 35—40 % в тесте цитотоксической активности. В модели интракраниальной глиомы C6 у крыс линии Wistar мы оценили эффективность локальной, внутриопухолевой инъекции Hsp70. Интраопухолевая доставка белка приводила к значительной задержке прогрессии опухолевого узла (по данным магнитно-резонансной томографии), что сопровождалось и увеличением выживаемости животных. Предполагая, что в основе наблюдаемого эффекта лежит иммуномодулирующая функция белка, мы оценили системный противоопухолевый ответ организма по продукции INF γ в ответ на стимуляцию спленоцитов клетками C6. В динамике наблюдалось повышение индуцированной продукции цитокина (до 516 ± 201 пг/мл, в контроле — 47 ± 9 пг/мл). По результатам иммуногистохимического анализа отмечалась выраженная инфильтрация опухолевой ткани *in situ* Т-лимфоцитами (CD3+, CD4+ и CD8+), а также NK-клетками (CD56+), что свидетельствует в пользу развития адаптивного иммунного ответа. Данное исследование демонстрирует противоопухолевую эффективность локальной доставки шаперона Hsp70 и возможность его применения в клинической онкологии.

ЭКРАНИРУЮЩИЙ ПИГМЕНТ КАМЕРНЫХ ГЛАЗ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ НАЗЕМНЫХ БРЮХОНОГИХ МОЛЛЮСКОВ. © И. П. Шенелева. Институт физиологии им. акад. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Международ-

ный университет Бремена, Германия, и Университет Лунда, Швеция, ishepeleva@rambler.ru.

В глазах обычно содержатся темные светоабсорбирующие пигменты — меланины. Пигмент встречается в самых разных типах глаз: от простых светочувствительных глазков у личинок некоторых плоских червей до сложных глаз членистоногих и камерных глаз беспозвоночных и позвоночных животных. Как правило, меланин сосредоточен в пигментных клетках, лежащих по соседству с фоторецепторными клетками, а у некоторых организмов — и в самих фоторецепторных клетках. У исследованных автором наземных брюхоногих моллюсков — слизня *Arión rufus* и улиток *Cochlodina laminata*, *Perforatella incarnata*, *Helicigona lapicida*, *Arianta arbustorum*, *Cepaea hortensis*, *Succinea putris* и *Trichia hispida* (из Южной Швеции) — на полутонких срезах камерных глаз различимы разный цвет и плотность расположения пигментных гранул. У *A. rufus*, так же как у наземного слизня *Limax maximus*, пигмент выглядит темно-коричневым, у *C. laminata*, *P. incarnata*, *H. lapicida*, *A. arbustorum*, *C. hortensis*, *S. putris* и *T. hispida*, так же как у многих других видов брюхоногих моллюсков, — черным. Более высокая плотность расположения пигментных гранул наблюдается в сетчатке у *C. hortensis*, *T. hispida*, *S. putris* и *H. lapicida* и менее высокая — у *P. incarnata*, *C. laminata*, *A. arbustorum* и *A. rufus*. При этом у всех видов моллюсков, адаптированных к темноте, гранулы в клетках сетчатки распределены равномерно. У *A. rufus*, так же как у морского слизня *Onhidium verriculatum*, на ультратонких срезах глаз гранулы пигментных клеток, согласно классификации Катагири и коллег, можно разделить по содержанию на три типа:

гранулы с электронно-плотным гомогенным веществом, гранулы с зернистым веществом меньшей электронной плотности, гранулы с зернистым веществом меньшей электронной плотности и с одним или несколькими электронно-плотными ядрышками разного размера. У *C. laminata*, *P. incarnata*, *H. lapicida*, *A. arbustorum*, *C. hortensis*, *S. putris* и *T. hispida* встречаются только пигментные гранулы с электронно-плотным гомогенным веществом.

Как известно, меланин может влиять на рассеяние света в сетчатке, которое снижает разрешающую способность глаз. Брюхоногие моллюски могут иметь один из двух экранирующих механизмов, направленных на повышение разрешающей способности: светозависимую миграцию пигментных гранул в апикальные отростки фоторецепторов, несущие микровиллы, или изоляцию микровилл фоторецепторов телами окружающих их пигментных клеток. Первый механизм позволяет уменьшить распространение света между микровиллами соседних клеток, второй механизм — предотвратить такое распространение. У исследованных видов моллюсков фоторецепторные клетки не имеют апикальных отростков и изолированы друг от друга пигментными клетками только на уровне своих клеточных тел. Таким образом, у моллюсков нет ни одного из двух возможных экранирующих механизмов, и рассеяние света в сетчатке становится лимитирующим фактором разрешающей способности их глаз.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов от фонда Marga und Kurt Moellgaard-Stiftung (Т 130/2370/2512/12659/03) (Германия) и Университета Лунда (Швеция).