

**ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ И СООБЩЕНИЙ,
ПРЕДСТАВЛЕННЫХ НА IV КОНФЕРЕНЦИЮ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ
(ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РАН, САНКТ-ПЕТЕРБУРГ, 18—20 МАРТА 2014 г.)**

УЧАСТИЕ АКТИНСВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА АЛЬФА-АКТИНИНА 4 В РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ NF-κB-ЗАВИСИМЫХ ГЕНОВ. © В. Ю. Аксенова, Н. В. Панюшев, Д. Г. Тентлер. Институт цитологии РАН и Лаборатория молекулярной фармакологии С.-Петербургского государственного технологического института (Технического университета), vasilisina@gmail.com

Альфа-актинин 4 (Actn4) — один из ключевых белков актинового цитоскелета, который участвует в формировании трехмерной организации актиновых фибрилл и образовании фокальных контактов. Кроме того, Actn4 способен мигрировать в ядро, где он взаимодействует с транскрипционными факторами и белками семейства hnRNP, участвующими в сплайсинге и транспорте мРНК. Изменение уровня экспрессии Actn4 наблюдается в некоторых типах опухолей, что ассоциируют с его влиянием на скорость пролиферации и миграции клеток. Предварительные данные показали, что гиперэкспрессия Actn4 усиливает экспрессию некоторых RelA/p65-зависимых генов (например, гена матриксной металлопротеиназы 3 (MMP3)), но только при активации самого NF-κB.

Для подтверждения взаимодействия RelA/p65 и Actn4 с промоторными областями генов-мишеней NF-κB был проведен люциферазный тест на активацию промотора гена MMP-3. Согласно предварительным данным, гиперэкспрессия RelA/p65 приводила к увеличению экспрессии люциферазы, что свидетельствует о применимости данной конструкции для исследования влияния Actn4 на активность RelA/p65 в отношении промотора гена MMP-3.

Также одной из поставленных нами задач было выяснить, является ли коактивация NF-κB следствием прямого взаимодействия Actn4 и p65/RelA на промоторах регулируемых генов. Для решения этой задачи было принято решение использовать метод хроматиновой иммунопреципитации. Нами было проведено выделение комплексов RelA/p65 с хроматином (участками промоторов NF-κB-регулируемых генов MMP-3, TNC и BAX) и определено присутствие в них RelA/p65, Actn4 и ДНК. В ходе дальнейших исследований планируется выявить группы генов, регулируемые Actn4 на фоне активации RelA/p65. Исследования будут проведены на клетках HEK293T с подавлением или гиперэкспрессией Actn4 с использованием различных вариантов метода хроматиновой иммунопреципитации (ChIP, ChIP-seq, ChIP-Western).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 12-04-32194-мол_а и 14-04-01910-а) и гранта пра-

вительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования, от 21 октября 2011 г. (№ 11.G34.31.0069).

ВЛИЯНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ИОНОВ ХЛОРА НА ДЕСЕНСИТИЗАЦИЮ ГАМК-ОПОСРЕДОВАННЫХ ИОННЫХ ТОКОВ НЕЙРОНОВ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ. © Д. В. Амахин, В. А. Семенов, Н. П. Веселкин. Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, dmitry.amakhin@gmail.com

В изолированных нейронах префронтальной коры головного мозга крысы методом пэтч-кламп в конфигурации «целая клетка» в условиях фиксации мембранного потенциала была исследована десенситизация ионных токов, вызываемых аппликацией ГАМК. Известно, что при длительной аппликации ГАМК регистрируемая данным методом амплитуда ионных токов снижается. Существуют свидетельства того, что в ряде случаев это падение амплитуды обусловлено не переходом ГАМК_A-рецепторов в десенситизированное состояние, а изменениями внутриклеточной концентрации ионов хлора, происходящими в ходе аппликации. В целях исследования природы наблюдаемой десенситизации токов было применено моделирование ответов нейрона на основе измеренных параметров — потенциала реверсии ионного тока и сопротивления системы нейрон—микропипетка. Моделирование ответов изолированных нейронов показало, что в ходе аппликации происходит рост суммарного сопротивления ГАМК_A-рецепторов, при этом скорость прироста сопротивления зависит от внутриклеточной концентрации ионов хлора. Также было продемонстрировано, что в ходе ответа на аппликацию ГАМК внутриклеточная концентрация ионов хлора может изменяться в зависимости от своего изначального уровня.

Полученные результаты позволяют количественно описать процесс падения амплитуды ответа в ходе проведения аппликации ГАМК, а также объяснить существенные различия в кинетике ГАМК-опосредованных ответов, зарегистрированных методом внутриклеточного введения и методом пэтч-кламп в конфигурации «целая клетка».

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

ект 11-04-00868) и программы президиума РАН «Механизмы интеграции молекулярных систем при реализации физиологических функций».

УРОВНИ ПЛОИДНОСТИ И ГИПЕРТРОФИИ КАРДИОМИОЦИТОВ ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА СЕРДЦА КРЫС НА РАЗНЫХ СРОКАХ ПОСЛЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИНФАРКТА МИОКАРДА. © Е. В. Байдюк, Г. А. Сакута, А. В. Степанов, Б. Н. Кудрявцев. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, katty_bay@mail.ru

Ишемические поражения сердца, в том числе инфаркт миокарда (ИМ), являются наиболее часто встречающимися патологиями сердечно-сосудистой системы человека. ИМ обычно затрагивает левый желудочек (ЛЖ) сердца и сопровождается гибелью до 40 % кардиомиоцитов (КМЦ). После острого периода на месте некротизированных клеток образуется рубцовая ткань и болезнь переходит в хроническую форму, которую определяют как хроническую сердечную недостаточность (ХСН). При переходе от острой фазы повреждения в хроническую происходит перестройка структуры и функции сердца — ремоделирование. В данной работе исследовали уровни плоидности и степень гипертрофии КМЦ на разных этапах ремоделирования постинфарктного миокарда.

Работа проведена на взрослых белых крысах-самцах линии Вистар, у которых вызывали ИМ методом перманентного лигирования левой коронарной артерии. Уровни плоидности и степень гипертрофии КМЦ определяли через 2, 6 и 26 нед после проведения операции на препаратах-мазках изолированных клеток, полученных методом щелочной диссоциации ткани. Уровни плоидности КМЦ определяли с помощью цитофлуориметрического метода на препаратах-мазках, окрашенных по Фельгену. Оказалось, что распределение КМЦ по классам плоидности было одинаковым в перинфарктной и интактной зонах ЛЖ крыс с ИМ и не отличалось от контрольных значений на всех сроках эксперимента. Наиболее часто встречающимся классом КМЦ в ЛЖ сердца крыс были двуклеточные клетки с диплоидными ядрами (>82 %).

Степень гипертрофии КМЦ определяли путем измерения сухой массы клеток с помощью интерференционного микроскопа. Измерение сухой массы КМЦ крыс через 2 нед после начала опыта показало, что у крыс с ХСН она снижалась до 3105.6 ± 238.8 пг в интактной и до 3631.4 ± 165.8 пг в перинфарктной зонах. Через 6 нед после проведения операции у крыс с ХСН наблюдалась гипертрофия КМЦ в ЛЖ сердца, причем сухая масса клеток в интактной (9104.3 ± 438.8 пг) и перинфарктной (9358.9 ± 433.5 пг) зонах не различалась и превышала таковую у контрольных крыс (5481.7 ± 527.6 пг) в среднем в 1.6 раза ($P < 0.05$). Через 26 нед после ИМ гипертрофия КМЦ сохранялась только в перинфарктной зоне, где сухая масса клеток была равна 8495.3 ± 176.4 пг, и на 24 % ($P < 0.05$) превышала значения данного параметра для контрольных (6750.4 ± 200.3 пг) крыс.

Таким образом, распределение КМЦ ЛЖ сердца по классам плоидности в процессе постинфарктного ремоделирования сердца не изменяется и не отличается от дан-

ного распределения у одновозрастных контрольных животных. Основным механизмом роста левого желудочка сердца при его ремоделировании является гипертрофия миоцитов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-00730 а).

РОЛЬ ЯДЕРНЫХ ЛАМИНОВ А/С В ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК. © М. А. Богданова, А. Б. Малашичева. Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, mar-bogdanova@mail.ru

Ядерные ламины являются основными белками ядерной оболочки и обеспечивают прочность ядерной мембраны клетки, а также взаимодействие внеядерных структур с компонентами ядра клетки. В последнее время стало понятно, что ламины играют не только структурную, но и функциональную роль в клетке. Самая известная из модификаций ламинной форма — прогерин — вызывает тяжелое нарушение развития — синдром преждевременного старения, или прогерия. Это известное заболевание является чрезвычайно редким. В то же время гораздо чаще точечные мутации гена *LMNA*, кодирующего ламин А/С, приводят к так называемым ламинопатиям — заболеваниям, при которых происходит поражение одного из типов тканей преимущественно мезенхимного происхождения. При этом мутации проявляются тканеспецифично — определенные мутации приводят к возникновению всегда одного фенотипа заболевания. Природа этого явления, как и механизмы, посредством которых ламины могут регулировать дифференцировку клеток, остаются слабо изученными. Целью настоящей работы было исследовать влияние различных тканеспецифичных мутаций в гене *LMNA* на дифференцировку мультипотентных мезенхимных стволовых клеток (ММСК) человека в остеогенном направлении, а также исследовать возможное участие в этом процессе сигнального пути Notch. Для этого в ММСК вводили мутантные формы ламин А/С, несущие ранее описанные мутации гена *LMNA*, вызывающие различные по типу затронутой ткани ламинопатии, и анализировали, как это влияет на эффективность остеогенной дифференцировки ММСК. Эффективность дифференцировки оценивали по количеству дифференцированных клеток через 21 день после индукции дифференцировки, а также при помощи оценки уровня экспрессии специфических маркеров адипогенной дифференцировки *SPPI*, *IBSP* и *BGLAP*. Мы показали, что мутации, вызывающие разные типы ламинопатий, по-разному влияют на эффективность остеогенной дифференцировки ММСК, что проявляется на морфологическом уровне и на уровне экспрессии специфических маркеров остеогенной дифференцировки. Одни мутации повышали эффективность дифференцировки, а другие — снижали. Таким образом, ламины А/С участвуют в регуляции дифференцировки ММСК, модулируя их дифференцировочный потенциал в зависимости от тканеспецифичности мутаций. Введение мутантных ламин в МСК совместно с введением активированного домена Notch изменяло экспрессию основной мишени сигнального пути Notch — *HEY1*. Таким образом, мутации *LMNA* влияют на взаимодействие ламин

A/C с компонентами сигнального пути Notch, и это может являться одним из механизмов влияния этих мутаций на дифференцировку клеток.

РОЛЬ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ NOTCH В ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА. © М. А. Богданова, А. М. Малашичева. Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова, mar-bogdanova@mail.ru

Сигнальный путь Notch является одним из главных сигнальных путей, влияющих на процесс дифференцировки стволовых клеток. В связи с этим существует большое количество достаточно распространенных заболеваний, связанных с мутациями генов-компонентов этого пути. Однако роль Notch-сигналинга в процессе клеточной дифференцировки недостаточно изучена. Исследования, касающиеся этого вопроса, весьма противоречивы, в основном связаны с изучением костных заболеваний и затрагивают преимущественно только остеогенное направление дифференцировки стволовых клеток. Поэтому целью нашего исследования стало изучение роли сигнального пути Notch в адипогенной и остеогенной дифференцировке мезенхимных стволовых клеток человека, выделенных из жировой ткани (МСК ЖТ). Для этого мы трансдуцировали МСК лентивирусной конструкцией, несущей вектор NICD гена, кодирующий внутриклеточный домен рецептора Notch1, далее с помощью специальных индукторов мы запускали остеогенную и адипогенную дифференцировку клеток, затем наблюдали результат на морфологическом уровне и на уровне экспрессии генов. Мы показали, что введение внутриклеточного домена Notch (NICD) приводит к активации генов сигнального пути Notch; кроме того, при дифференцировке клеток в обоих направлениях происходит увеличение экспрессии данных генов, что говорит о запуске Notch-сигналинга в процессе клеточной дифференцировки. И наконец, введение экзогенного Notch (NICD) снижает экспрессию генов остеогенной и адипогенной дифференцировки клеток. Таким образом, в нашем исследовании активация сигнального пути Notch мешает дифференцировке МСК в двух направлениях. Этот результат, возможно, является универсальным и может зависеть от различных факторов.

ПАТОЛОГИЧЕСКОЕ УВЕЛИЧЕНИЕ ДЕПОУПРАВЛЯЕМОГО ВХОДА КАЛЬЦИЯ В НЕЙРОНАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА. © В. А. Вигонт, Ю. А. Колобкова, О. А. Зимица, Е. В. Казначеева. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, vvigand@gmail.com

Болезнь Хантингтона (БХ) является аутосомно-доминантным нейродегенеративным заболеванием, вызываемым увеличением числа глутаминкодирующих повторов в первом экзоне гена белка хантингтина. В норме длина полиглутаминового тракта не должна превышать 35 остатков глутамина. Возраст, в котором начинают проявляться симптомы заболевания, равно как и степень тяжести заболевания напрямую зависят от количества тринуклеотидных повторов, кодирующих полиглутаминовый тракт хантингтина

На данный момент связь между экспрессией мутантного хантингтина и процессами дегенерации нейронов до конца неясна. Тем не менее в последнее время появляется все больше работ, в которых патогенез нейродегенеративных заболеваний, в том числе БХ, связывают с нарушениями нейрональной кальциевой сигнализации.

Мы смоделировали БХ в различных клеточных линиях с помощью доставки в клетки генетического конструкта для экспрессии гена патологического мутантного хантингтина с длиной тракта 138 остатков глутамина (или конструкта для экспрессии первого экзона мутантного хантингтина, содержащего в себе полиглутаминовый тракт 138Q). Доставка в клетки осуществлялась с помощью трансфекции либо лентивирусного заражения.

С помощью метода локальной фиксации потенциала (patch-clamp в конфигурации whole-cell) мы исследовали депоуправляемые токи кальция в моделях БХ на клетках человеческой нейробластомы (SK-N-SH), мышинной нейробластомы (Neuro2A) и в первичной культуре нейронов стриатума, изолированных из новорожденных мышат (MSN).

Данные электрофизиологических экспериментов показали, что депоуправляемый вход кальция существенно повышен по сравнению с контролем во всех приведенных клеточных линиях, моделирующих БХ.

Также мы показали наличие аномально большого депоуправляемого входа кальция в Хантингтон-специфичных человеческих нейронах. Эти нейроны были получены путем дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых (iPS) клеток, полученных репрограммированием фибробластов, изолированных у пациентов с БХ. В качестве контроля использовали как нейроны, полученные из нормальных клеток iPS, так и нейроны, дифференцированные из эмбриональных стволовых клеток. Необходимо подчеркнуть, что в данной модели мы имели дело с эндогенной экспрессией мутантного хантингтина, а также то, что количество остатков глутамина в тракте было всего 40–45, т. е. близко к минимальной длине тракта, при котором наблюдается манифестация заболевания. Дальнейшие эксперименты были направлены на исследование потенциального терапевтического агента EVP4593. Мы показали, что соединение EVP4593 способно ингибировать токи через депоуправляемые каналы в моделях БХ на клетках SK-N-SH, MSN, а также на человеческих нейронах.

Было сделано заключение о том, что депоуправляемый вход кальция является новой перспективной мишенью для разработки терапевтических подходов к лечению БХ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», гранта ERA-NET и стипендии президента РФ.

УНИКАЛЬНЫЕ ПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА IBPA (HSP20) МИКОПЛАЗМЫ *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII*. © И. Е. Вишняков,¹ * А. Л. Рунов,¹ А. Р. Каюмов,² С. А. Левицкий,³ А. В. Сабанцев,⁴ С. Н. Борхсениус.¹ ¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ² Казанский (Приволжский) федеральный университет, ³ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова и ⁴ НИК «Нанобиотех-

нологии», С.-Петербургский государственный политехнический университет, *innvish@gmail.com

Acholeplasma laidlawii входит в топ-5 контаминантов клеточных культур и является единственной микоплазмой, обладающей способностью жить вне организзма хозяина. Мы предполагаем, что в значительной мере повышенная устойчивость микоплазмы данного вида к стрессам обусловлена наличием у нее малого белка теплового шока — IbrA (Hsp20). В данной работе мы обнаружили, что сверхпродукция рекомбинантного белка IbrA в клетках штамма-продуцента *Escherichia coli* BL21 (DE3) приводит к значительному повышению устойчивости кишечной палочки к воздействию сильного теплового шока. Клетки, трансформированные плазмидой *ribrA*, сконструированной на основе вектора pET-15b и несущей полноразмерный ген *ibrA A. laidlawii*, выращивали на жидкой среде LB, содержащей селективные антибиотики, при 37 °C (200 об/мин) до оптической плотности OD₆₀₀ = 0.6. Затем добавляли индуктор IPTG, инкубировали в течение 2 ч в тех же условиях, после чего культуру разделяли на равные по объему части. Одну часть инкубировали при 46 °C в течение 30 мин, другую оставляли на 37 °C. Сразу вслед за этим делали серийные разведения, высевали клетки *E. coli* на L-агар, и культивировали при 37 °C в течение 12 ч, после чего подсчитывали количество КОЕ. Контролем служил штамм *E. coli*, трансформированный исходным вектором pET-15b. Чтобы учесть влияние индуктора, проводили дополнительный эксперимент в тех же условиях с использованием как контрольного, так и опытного штаммов, без добавления IPTG. Было показано, что сверхпродукция IbrA обеспечивает более чем 20-кратное увеличение количества жизнеспособных клеток *E. coli* при тепловом шоке по сравнению с контролем. Чтобы понять, каким образом рекомбинантный IbrA повышает термоустойчивость клеток *E. coli*, необходимо определить его белки-субстраты. Для этих целей мы адаптировали метод His6 pull-down, используя шаперонные свойства мБТШ. Был получен клеточный экстракт белков *E. coli* в буфере А, который разделили на четыре равные части. Две части, в одну из которых был добавлен IbrA, подвергли температурному воздействию (46 °C, 30 мин), другие две части, в одну из которых также добавили мБТШ, хранили в течение 0.5 ч при 4 °C. Затем материал всех четырех фракций наносили на Ni-NTA-агарозу, промывали исходным буфером с добавлением 20 мМ имидазола и 500 мМ NaCl, чтобы удалить все неспецифически связавшиеся как с агарозой, так и с мБТШ белки. Комплексы IbrA—субстрат элюировали буфером А, содержащим 200 мМ имидазола и 500 мМ NaCl, белковые паттерны анализировали при помощи электрофореза в ПААГ, после чего белки экстрагировали из геля, подвергали трипсинолизу и анализировали методом масс-спектрометрии. Было идентифицировано 12 мажорных белков *E. coli*, специфически взаимодействующих с IbrA при нагреве. Таким образом, IbrA *A. laidlawii* является уникальным протектором, защищающим белки *E. coli* от тепловой денатурации и способствующим многократному увеличению жизнестойкости трансформированных клеток в условиях сильного теплового шока.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-02070_a).

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ HDAC НА РЕПАРАЦИЮ ПОВРЕЖДЕННОЙ ДНК. © О. О. Гнедина, М. В. Игotti, С. Б. Светликова, В. А. Поспелов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, olga.o.gnedina@gmail.com

Как известно, ингибиторы гистоновых деацетилаз (HDAC) способны подавить опухолеобразование, поскольку вызывают остановку клеточного цикла, индуцируют преждевременное клеточное старение, или апоптоз. Малоизученным действием ингибиторов является их влияние на способность трансформированных клеток репарировать двухнитевые разрывы ДНК (DSBs), которые являются наиболее серьезными для клетки повреждениями. От способности клетки к репарации полученных повреждений ДНК зависит ее дальнейшая судьба, и снижение эффективности механизмов репарации ведет напрямую к индукции остановки клеточного цикла и(или) апоптоза. Выбор механизма репарации DSBs во многом определяется фазой клеточного цикла. Механизм по типу гомологичной рекомбинации (HR) восстанавливает ДНК до входа клетки в фазу митоза, во время или сразу после репликации ДНК в фазе клеточного цикла S или G₂, когда сестринские хроматиды являются более доступными. В отличие от HR репарация по типу негомологичного соединения концов (NHEJ) преобладает в фазе G₁ клеточного цикла, когда клетки растут, но еще не готовы к делению. Репарация этого типа используется реже вне фазы G₁, но сохраняет некоторую активность в течение всего клеточного цикла. В клетках человека для восстановления DSBs, привнесенных генотоксическими агентами, такими как облучение, используется в основном репарация NHEJ (Jeggo, Lavin, 2009). Ранее нами было показано, что ингибиторы HDAC в трансформированных клетках E1A+Ras приводят к возникновению пролиферативного блока G₁/S, а также к накоплению фокусов репарации ДНК, маркированных фосфорилированным гистоном H2AX (Abramova et al., 2011). Для того чтобы исследовать влияние ингибиторов HDAC на репарацию поврежденной ДНК, мы использовали плазмиду pGL3-basic, несущую репортерный ген люциферазы, в которую разными способами вносились двухнитевые разрывы, приводящие к невозможности экспрессии гена люциферазы. Эффективность репарации в присутствии и в отсутствие ингибитора HDAC — бутирата натрия (NaB) — оценивали количественно, методом восстановления (реактивации) транскрипции люциферазы (HCR, host cell reactivation assay). Для изучения влияния ингибиторов HDAC на репарацию двухнитевых разрывов ДНК по механизму NHEJ двухнитевые разрывы в pGL3-basic вносили действием эндонуклеазы рестрикции по сайту внутри репортерного гена. Поврежденной плазмидой и контрольной, интактной, плазмидой трансфицировали клетки E1A+Ras, после чего определяли эффективность репарации в присутствии и в отсутствие NaB. Для изучения влияния ингибиторов HDAC на репарацию по механизму HR трансфекцию проводили набором из двух плазмид pGL3-basic, рестрицированных двумя наборами эндонуклеаз с образованием перекрывающихся фрагментов. Данные анализа HCR показали, что в трансформированных клетках E1A+Ras бутират натрия подавляет репарацию DSBs, реализуемую по механизму NHEJ. Однако в клетках линии NIH3T3, не являющихся трансформированными, а также в нормальных клетках REF52 подобного эффекта подавления эффективности репарации при действии NaB не наблюдалось. В свою очередь репарация по

механизму HR в трансформированных онкогенном клетках E1A+Ras не ингибируется бутиратом натрия.

РАЗРАБОТКА МОДЕЛЕЙ МИОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ IN VITRO С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЕТОК ЛИНИИ C2C12 И САТЕЛЛИТНЫХ КЛЕТОК МЫШИ.

© А. Я. Давыдова, Р. И. Дмитриева. Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, aldavydova@mail.ru

При некоторых патологиях, сопровождающихся нарушением целостности мышечной ткани, программа регенерации нарушается, мышечная ткань деградирует и скелетные мышцы заселяются адипоцитами. Неизвестно как происходит адипоцитоз в мышечной ткани, так и то, какие стимулы могут способствовать их формированию *in vivo*. Разработка адекватных экспериментальных моделей исследования регенерации мышечной ткани *in vitro* позволит раскрыть механизмы развития таких заболеваний и будет способствовать разработке новых терапевтических стратегий. В данной работе была предпринята попытка прямого сравнения двух клеточных моделей исследования механизмов мышечной дифференцировки: линии мышечных миобластов C2C12 и модели, включающей в себя резидентные клетки мышечной ткани двух типов, сателлитные клетки (СК) и фибро-адипогенные клетки-предшественники мезенхимного происхождения (ФАК). СК и ФАК выделяли по описанному ранее методу. Стимуляцию миогенной и адипогенной дифференцировки проводили ранее описанными методами, динамику экспрессии маркеров дифференцировок оценивали ПЦР в реальном времени и иммуноцитохимическими методами. Было показано, что все клетки в контрольных условиях (день 0) имеют миогенную природу и являются Myf5⁺ (экспрессия выражена в условных единицах): ФАК — 2.3 ± 0.8 , C2C12 — 6.0 ± 0.9 , СК — 3.3 ± 0.3 . При этом уровень экспрессии адипомаркеров в день 0 был существенно выше у ФАК (Ucp1 — 459.5 ± 25.4 , PPAR γ — 79.6 ± 17.9 , Fabp4 — 7329.9 ± 1173.7), чем в СК (Ucp1 — 9.0 ± 2.3 , PPAR γ — 17.6 ± 1.1 , Fabp4 — 70.4 ± 10.4) и C2C12 (Ucp1 — 1.6 ± 0.2 , PPAR γ — 2.3 ± 0.6 , Fabp4 — 1.6 ± 0.4). Также были показаны существенные различия в динамике экспрессии миомаркеров в ходе миогенной дифференцировки. Так, для C2C12 (день 0—день 15) были показаны снижение уровня экспрессии Myf5 (с 5.9 ± 0.9 до 3.1 ± 0.3) и рост экспрессии поздних маркеров Mrf4 (с 1.6 ± 0.5 до 4.7 ± 0.6), MyoD (с 1.6 ± 0.5 до 5.4 ± 0.4) и MyoG (с 1.5 ± 0.4 до 71.4 ± 6.3). СК демонстрировали более высокий базальный уровень экспрессии миомаркеров (день 0): Mrf4 — 323.8 ± 8.1 , MyoD — 1790.1 ± 273.5 ; MyoG — 559.3 ± 70.2 , а также и заметные изменения морфологии и рост экспрессии позднего маркера дифференцировки Mrf4 уже к 4-му дню после стимуляции до 736.5 ± 46.0 . Смешанная культура СК и ФАК при стимуляции адипогенной дифференцировки уже на 4-й день показала ярко выраженную морфологическую картину формирования миотрубок и наиболее существенный рост экспрессии позднего маркера дифференцировки Mrf4 (до 2411.1 ± 49.9) на фоне увеличения экспрессии таких адипомаркеров, как PPAR γ (с 17.6 ± 1.1 до 53.8 ± 0.3), Pgc1a (с 45.2 ± 2.3 до 140.9 ± 5.3) и Fabp4 (с 70.4 ± 10.4 до 11954.2 ± 2247.4). Было выявлено, что СК ввиду лучшей морфологической картины и динамики генной экспрессии лучше подходят для разработки моде-

ли, чем C2C12. Также было показано, что межклеточные взаимодействия между СК и ФАК могут играть важную роль в развитии и регенерации мышечной ткани. Дальнейшие исследования необходимы для выяснения механизмов регуляции взаимодействия ФАК и СК и роли этих механизмов в процессах регенерации и дегенерации мышечной ткани.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДОМЕНА УБИКВИТИНЛИГАЗЫ PIRH2, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩЕГО С MDM2.

© А. А. Дакс, О. Ю. Шувалов, О. А. Федорова, Н. А. Барлев. С.-Петербургский государственный технологический институт (Технический университет) и Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, alexandra.daks@gmail.com

Белок p53 является одним из важнейших онкосупрессоров благодаря ключевой роли в регуляции клеточного цикла и запуске апоптоза. Нарушение функционирования данного белка и снижение его уровня в клетке могут приводить к изменению пролиферативного статуса клеток и в конечном итоге — к опухолеобразованию. Одним из основных механизмов регуляции уровня p53 в клетке является убиквитинзависимая протеасомная деградация.

Процесс убиквитинилирования белков, в частности p53, катализируется тремя ферментативными каскадами. Ферменты первого каскада — E1 — активирующие, второго — E2 — конъюгирующие, третьего — E3 — лигирующие. Именно E3-лигазы определяют специфичность реакции убиквитинилирования, т. е. то, какой именно белок будет ковалентно модифицирован убиквитином.

Белки Pirh2 и Mdm2 являются E3-убиквитинлигазами, модифицирующими белок p53. Сверхэкспрессия данных белков характерна для многих типов рака, в том числе рака легких и рака простаты. Помимо связывания с p53 для данных белков показано, что Pirh2 и Mdm2 взаимодействуют друг с другом. При сверхэкспрессии одного из данных белков стабилизируется другой. Помимо этого, показано синергичное действие Pirh2 и Mdm2 в отношении p53. Таким образом, возможным направлением разработки противоопухолевых препаратов является получение низкомолекулярных ингибиторов связывания белков Pirh2 и Mdm2. Для этого необходимо наиболее полно охарактеризовать участки данных белков, вовлеченные в их взаимодействие друг с другом.

На сегодняшний день известно, что участок Mdm2, ответственный за взаимодействие с Pirh2, включает в себя 151—491-ю аминокислоты, что соответствует центральному «кислостому» домену и С-концевому домену типа «цинковый палец» данного белка. Также показано, что изоформа Pirh2C, у которой отсутствует С-концевой домен, способна взаимодействовать с Mdm2.

Для определения домена Pirh2, взаимодействующего с Mdm2, нами была осуществлена котрансфекция векторами, кодирующими отдельные домены белка Pirh2: CTD(Pirh2)-3FLAG, RING (Pirh2)-3FLAG и NTD(Pirh2)-3FLAG, а также вектором, кодирующим участок белка Mdm2, который, по литературным данным, отвечает за взаимодействие с Pirh2 (151—491-я аминокислоты). После этого была проведена коиммунопреципитация белков, взаимодействующих с каждым из доменов Pirh2, при помощи специфических антител к FLAG-пептиду. Mdm2 выявляли с помощью Вестерн-блоттинга и последующего окрашивания моноклональными антителами, специфически связывающимися Mdm2. Для исключения непрямого

взаимодействия Pirh2 и Mdm2, опосредованного белком p53, была выбрана нокаутная клеточная линия НСТ 116 (p53^{-/-}).

Нами впервые был определен домен белка Pirh2, ответственный за взаимодействие с Mdm2, что в будущем облегчит поиск низкомолекулярных ингибиторов взаимодействия между Pirh2 и Mdm2.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта правительства Российской Федерации № 11.G34.31.0069 от 21.10.2011 и Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 14-04-32242 мол_a и 13-04-01024 А).

РОЛЬ МЕМБРАННЫХ ЛИПИДОВ В ФОРМИРОВАНИИ И ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ПОЛИЕНОВЫХ ПОР В ЛИПИДНЫХ БИСЛОЯХ. © С. С. Ефимова, Л. В. Щагина, О. С. Остроумова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ssefimova@mail.ru

Полиеновые макролидные антибиотики на сегодняшний день являются самыми эффективными противогрибковыми соединениями, несмотря на их высокую токсичность. Препараты на их основе используются для лечения пораженных грибковой инфекцией пациентов с иммунодефицитом статусом, в частности после трансплантации органов или больных СПИДом. Токсичность полиеновых антибиотиков резко ограничивает их применение и требует создания новых лекарственных форм. В связи с этим основным направлением работ является создание их липидоассоциированных форм (Shigemitsu et al., 2011). Такой подход требует детального исследования механизмов связывания полиеновых макролидов с липидной составляющей мембраны. Для изучения последних использовали мембраноактивные соединения, дипольные модификаторы, которые способны изменять скачок потенциала на границе раздела мембрана—раствор (Efimova, Ostroumova, 2012) и влиять на фазовое разделение в мембране (Ostroumova et al., 2014).

Целью работы являлось установление влияния флоретина и RH 421 на равновесный трансмембранный ток, индуцированный полиеновым антибиотиком амфотерицином В (*I*) в липидных бислоях, включающих в себя различные фосфо- и сфинголипиды. Бислои мембраны формировали по методу Монтала и Мюллера (Montal, Muller, 1972) из смеси фосфолипид : эргостерин (Эрг) (67 : 33 М%) или фосфолипид : Эрг : сфинголипид (53 : 27 : 20 М%) в 2 М КСl (рН 7.0). Были выбраны фосфолипиды дифитаноилфосфосерин (ДФФС), пальмитоолеилфосфохолин (ПОФХ), диолеилфосфосерин (ДОФС), диолеилэтаноламин (ДОФЭ) и диолеилфосфохолин (ДОФХ) и сфинголипиды N-стеароил-фитосфингозин из *Saccharomyces cerevisiae* (СФС), сфингомиелин из мозга свиней (СМ) и N-стеароил-D-эритро-сфинганин (СЭС).

Установлено, что введение 20 мкМ флоретина в околомембранный раствор приводит к существенному увеличению *I* в Эрг-содержащих бислоях из ПОФХ (в 12 раз) и ДОФХ (в 4 раза), в то время как этот модификатор не влияет на *I* в Эрг-содержащих мембранах, сформированных с участием ДФФХ, ДФФС, ДОФЭ и ДОФС. Добавка 5 мкМ RH 421 вызывает многократное увеличение *I* через Эрг-содержащие бислои из ДФФХ (в 15 раз) и ДФФС (в 42 раза) и не влияет на *I* в Эрг-содержащих мембранах, включающих в себя ПОФХ, ДОФХ, ДОФЭ и ДОФС. По-

казано, что добавка 20 мкМ флоретина в околомембранный раствор увеличивает в 2 раза *I* через ДФФХ/Эрг/СФС-мембраны, а 5 мкМ RH 421 — через ДФФС/Эрг/СФС-бислои. При замене сфинголипидной или фосфолипидной составляющей в указанных смесях увеличения *I* в присутствии модификаторов не наблюдалось. Возможной причиной наблюдаемых различий является влияние флоретина и RH 421 на физико-химические свойства стероино- и сфинголипидобогащенных упорядоченных мембранных доменов, включающих в себя молекулы полиенового антибиотика.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-33121), НШ-1721.2014.4 и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

ИЗМЕНЕНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ ПРОТЕАСОМ В ОТВЕТ НА ГЕНОТОКСИЧЕСКИЙ СТРЕСС. © Ю. Я. Зайкова, А. С. Цимоха. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, vat-julia@yandex.ru

Убиквитин-протеасомная система (УПС) осуществляет большую часть регулируемого протеолиза в клетке, занимая одно из ключевых мест в регуляции основных внутриклеточных процессов (регуляции транскрипции, продвижении клетки по клеточному циклу, репарации ДНК и др.). Протеолитическим ядром этой системы являются 26S протеасомы — мультисубъединичные белковые комплексы, которые состоят из протеолитической коревой частицы, 20S протеасомы и одного или двух 19S регуляторов.

Согласно современным представлениям, протеасомы присутствуют в цитоплазме и в ядрах всех эукариотических клеток, однако распределение протеасом между ядром и цитоплазмой сильно различается в зависимости как от типа клеток, так и от физиологического состояния самих клеток. Полагают, что такое распределение протеасом определяется протеолитической функцией в силу сопутствующего присутствия других компонентов УПС. Известно, что при индукции генотоксического стресса с помощью доксорубина наблюдается накопление протеасом в ядре. Литературные данные утверждают, что протеасомы связывают доксорубин и транспортируют его в ядро. Возникает вопрос: происходит ли рекрутирование протеасом в ответ на генотоксический стресс, вызванный в клетках другими агентами?

Мы использовали модель индукции генотоксического стресса в клетках линии HeLa, стабильно экспрессирующих слитый с зеленым флуоресцентным белком (EGFP) протеасомный белок PSMB4. Генотоксический стресс в клетках вызывали воздействием доксорубина и цис-платина. В качестве контроля использовали необработанные клетки и клетки под действием окислительного стресса (при помощи перекиси водорода). Распределение по клеточному циклу и апоптотические изменения в клетках регистрировали с помощью проточной цитофлуориметрии. Внутриклеточное распределение протеасом визуализировали с помощью флуоресцентной микроскопии. Воздействие на клетки доксорубина и цис-платина вызывало перераспределение протеасом в клетке: при увеличении концентрации ДНК-повреждающих агентов мы наблюдали транспорт протеасом из цитоплазмы в ядра,

что неудивительно в силу значимости убиквитин-протеасомного протеолиза в регуляции репарации ДНК и апоптозе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-01397а).

ДАВЛЕНИЕ ЦИТОЗОЛЯ КАК ДВИГАТЕЛЬ КЛЕТОЧНОЙ МИГРАЦИИ. © *Е. А. Затоловский*. Кембриджский университет, Великобритания, ZatulovskyE@mail.ru

Клеточная подвижность играет центральную роль в таких биологических процессах, как иммунный ответ, эмбриональное развитие, заживление ран и нейрогенез, а также определяет способность опухолей распространяться и метастазировать. В последние десятилетия достигнут большой прогресс в изучении молекулярных основ клеточной миграции. Так, согласно наиболее общепринятой парадигме, активная полимеризация разветвленных сетей F-актина на переднем крае клетки создает давление, которое толкает плазматическую мембрану вперед. После этого сформировавшееся за счет давления актина выпячивание в передней части клетки — например псевдоподия или ламеллоподия, формирует адгезивные контакты, а задний край клетки подтягивается с помощью локального сокращения актомиозинового кортекса. За счет этого обеспечивается общее перемещение клетки вперед. Описанный механизм был подтвержден множеством экспериментов по изучению миграции клеток на твердой подложке. Однако в последние несколько лет был опубликован ряд статей, свидетельствующих о том, что описанный механизм не является универсальным. Оказалось, что в более физиологических условиях, когда клетки, в том числе и опухолевые, движутся сквозь трехмерный матрикс или фрагмент ткани, вместо псевдоподий они активно формируют другой тип клеточных выпячиваний, называемый «блебами». Блебы в отличие от псевдоподий и ламеллоподий растут не в результате полимеризации актина, а под действием внутриклеточного давления цитозоля: когда в результате сокращения актомиозинового кортекса давление в клетке возрастает, под действием этих гидростатических сил участок мембраны может локально открепиться от лежащего под ней актинового кортекса, и тогда в данном месте формируется гладкое выпячивание сферической формы — блеб. Если такие блебы образуются в значительном количестве преимущественно на одном и том же крае клетки, то это обеспечивает общее перемещение клетки в направлении формирования выпячиваний. В данной работе исследуется роль блебов в направленном движении клеток — хемотаксисе. Для этого использована популярная клеточная модель — социальная амeba *Dictyostelium discoideum*. Показано, что в процессе хемотаксиса клетки *D. discoideum* способны формировать на переднем крае как псевдоподии, так и блебы, причем соотношение этих структур смещается в сторону блебов в процессе развития клеток и их объединения в трехмерные многоклеточные агрегаты. Выдвинута гипотеза о том, что механическое сопротивление среды стимулирует клетки к переключению с актинзависимого режима движения на использование гидростатического давления цитозоля, поскольку последний дает возможность прилагать к среде большую силу. Также в данной работе продемонстрировано, что место формиро-

вания блебов на поверхности клетки напрямую определяется направлением градиента хемоаттрактанта — блебы образуются в той части клетки, которая находится ближе к источнику этого вещества. Далее исследуются и обсуждаются возможные механизмы, определяющие место формирования блебов, включая локальную модификацию липидного состава плазматической мембраны, изменения в белках актинового кортекса, а также геометрию мембраны.

РОЛЬ КАЛЬЦИЕВЫХ СЕНСОРОВ STIM1 И STIM2 В РЕГУЛЯЦИИ ДЕПОУПРАВЛЯЕМЫХ КАНАЛОВ. © *В. О. Камалетдинова, Г. Н. Можяева, А. В. Шалыгин*. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, elifein@mail.ru

Ионы кальция (Ca^{2+}) — важнейший вторичный посредник, регулирующий широкий спектр внутриклеточных процессов. В регуляции кальциевого гомеостаза и генерации кальциевых сигналов ключевую роль играют депоуправляемые кальциевые каналы плазматической мембраны, активирующиеся после опустошения внутриклеточных кальциевых депо. Сигнал от опустошенного депо к каналам плазматической мембраны передают кальциевые сенсоры эндоплазматического ретикулума белки STIM1 и STIM2.

В состав депоуправляемых каналов входят белки двух семейств — Orai и TRPC. Белок STIM1 активирует каналы Orai и TRPC, белок STIM2 также участвует в активации каналов Orai, однако неизвестно, может ли он регулировать другие депоуправляемые каналы. Цель этой работы — выяснить, различается ли регуляция разных депоуправляемых каналов белками STIM1 и STIM2.

В клетках линии НЕК293 были охарактеризованы кальциевые каналы с разными электрофизиологическими свойствами — I_{min} , I_{max} и I_{NS} (Bugaj et al., 2005).

Методом patch-clamp в конфигурации cell-attached было показано, что в клетках линии НЕК293 в ответ на опустошение депо с помощью приложения 1 мкМ тапси-гаргина (Tg) к внешней поверхности клеточной мембраны активируются каналы I_{max} и I_{NS} . Последующее добавление УТФ вызывало активацию каналов I_{min} , I_{max} и I_{NS} . При оверэкспрессии белка STIM1 опустошение депо с помощью 1 мкМ Tg также не вызывало активации каналов I_{min} , в то время как регистрировались каналы I_{max} и I_{NS} . Последующее добавление 100 мкМ УТФ вызывало активацию каналов I_{min} , I_{max} и I_{NS} . При нокдауне кальциевого сенсора STIM1 каналы I_{min} становились депоуправляемыми и активировались в ответ на добавление 1 мкМ Tg, каналы I_{max} регистрировались значительно реже, а каналы I_{NS} не активировались совсем. Можно предположить, что каналы I_{min} регулируются другим кальциевым сенсором, а именно белком STIM2.

Следующей задачей было отделить активацию белка STIM2 от STIM1. Белки STIM2 более чувствительны к изменению концентрации Ca^{2+} , чем белки STIM1, и активируются уже при частичном опустошении депо. Методом измерения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} с помощью флуоресцентного зонда Fura-2AM было показано, что 10 нМ Tg вызывает частичное опустошение депо. Методом patch-clamp в конфигурации cell-attached было выявлено, что добавление к наружной поверхности клеточной мембраны 10 нМ Tg активирует каналы I_{min} в клетках линии НЕК293. При последующем добавлении 100 мкМ

УТФ каналы I_{\min} активировались чаще. Частичное опустошение депо с помощью 10 нМ Tg в клетках, с оверэкспрессией гена STIM2 каналы I_{\min} регистрировались значительно чаще. В клетках с нокдауном гена STIM2 1 мкМ Tg не вызывает активации каналов I_{\min} . Последующее добавление УТФ в том же эксперименте активирует каналы I_{\min} .

На основе полученных данных можно сделать следующие выводы. Каналы I_{NS} регулируются только белком STIM1. Каналы I_{\min} дозозависимо регулируются белком STIM2. По-видимому, чувствительность каналов I_{\min} к состоянию депо зависит от соотношения активированных белков STIM1 и STIM2. Каналы I_{\max} могут регулироваться как STIM1, так и STIM2. Таким образом, можно сделать вывод о том, что разные типы каналов регулируются кальциевыми сенсорами STIM1 и STIM2 неодианово.

ТОЧЕЧНАЯ МУТАЦИЯ GLN147PRO В ТРОПОМИОЗИНЕ, ВЫЗЫВАЮЩАЯ НЕМАЛИНОВУЮ МИОПАТИЮ, РАЗОБЩАЕТ СОГЛАСОВАННЫЕ КОНФОРМАЦИОННЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ АКТОМИОЗИНА. © О. Е. Карпичева,¹ А. О. Симонян,^{1, 2} Ч. С. Редвуд,³ Ю. С. Боровиков.¹
¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ² С.-Петербургский государственный университет и ³ Оксфордский университет, Великобритания, olexiya6@ya.ru

Немалиновая миопатия — одно из наследственных заболеваний скелетных мышц человека, характеризующееся слабостью и гипотонией мышц, а также присутствием агрегатов саркомерных белков на периферии мышечных волокон, так называемых немалиновых тел. Известно, что развитие этого заболевания связано с точечными мутациями в генах, кодирующих белки тонкого филамента. Для изучения молекулярного механизма нарушения сократительной функции мышц была экспрессирована β -изоформа тропомиозина человека «дикого типа» и с мутацией Gln147Pro, вызывающей немалиновую миопатию. Метод кругового дихроизма не выявил изменений во вторичной структуре мутантной формы тропомиозина. Несмотря на это, мутация значительно снижает сродство между тропомиозином и F-актином, что показано с помощью высокоскоростного соосаждения белков. Однако в мышечном волокне в отличие от раствора белков тропомиозин с мутацией Gln147Pro связывается с актином в достаточном количестве, что продемонстрировано с использованием тропомиозина, специфически модифицированного флуоресцентным зондом 5-IAF. Методом поляризационной флуориметрии впервые показано, что тропомиозин с мутацией Gln147Pro изменяет структурное состояние актиновой нити, увеличивая количество включенных мономеров актина при сильном взаимодействии миозина и актина и уменьшая их количество при слабом взаимодействии. В присутствии мутантной формы тропомиозина нарушается образование соответствующего структурного состояния головки миозина при сильной и слабой формах связывания с актином. Конформационные перестройки головки миозина при переходе актомиозина из слабой в сильную форму связывания, существенные для генерации силы в мышце, ингибируются. Нарушение согласованных конформационных перестроек актомиозина в АТФазном цикле может являться причиной развития мышечной слабости.

АНОМАЛЬНОЕ УВЕЛИЧЕНИЕ ДЕПОУПРАВЛЯЕМОГО ВХОДА КАЛЬЦИЯ В КЛЕТКАХ, МОДЕЛИРУЮЩИХ БОЛЕЗНЬ ХАНТИНГТОНА. © Ю. А. Колобкова, В. А. Вигонт, О. А. Зимица, Е. В. Казначеева. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, kolobkova_yulia@mail.ru

Кальций является универсальным вторичным посредником в клетке. Один из наиболее общих типов притока кальция из внеклеточной среды — депоуправляемый кальциевый вход. Для его активации необходимо понижение концентрации кальция во внутриклеточных депо. Наличие депоуправляемого кальциевого входа показано как для электронеозбудимых клеток, так и для нейронов. Болезнь Хантингтона (БХ) является аутосомно-доминантным нейродегенеративным заболеванием, вызываемым увеличением числа глутаминкодирующих повторов в первом экзоне гена белка хантингтина. В норме длина полиглутаминового тракта не должна превышать 35 остатков глутамина, в то время как при заболевании наблюдаются тракты длиной до 90 глутаминов и более. На данный момент связь между экспрессией мутантного хантингтина и процессами дегенерации нейронов до конца неясна. Тем не менее в последнее время появляется все больше работ, в которых патогенез нейродегенеративных заболеваний, в том числе БХ, связывают с нарушениями нейрональной кальциевой сигнализации. При БХ в первую очередь поражаются срединные шипиковые нейроны стриатума (MSN). Поэтому особый интерес представляет изучение нарушения кальциевой сигнализации в модели БХ на первичной культуре MSN. Для того чтобы смоделировать БХ в клетках первичной культуры нейронов стриатума мыши, мы с помощью лентивирусной инфекции сверхэкспрессировали 1-й экзон мутантного белка хантингтина, содержащего полиглутаминовый тракт длиной 138 остатков глутамина (клетки MSN-138Q). Для исследования депоуправляемого кальциевого входа в этих клетках опустошение внутриклеточных кальциевых депо вызывали с помощью тапсигаргина. Тапсигаргин является необратимым блокатором кальциевых АТФаз эндоплазматического ретикула, и при его аппликации кальций выходит из депо пассивно через каналы утечки, что позволяет говорить о наблюдаемом последующем входе кальция как об опосредованном депоуправляемыми каналами плазматической мембраны. В результате проведенных нами электрофизиологических экспериментов (метод patch-clamp в конфигурации whole-cell) было обнаружено, что депо-управляемый вход кальция в клетках MSN-138Q существенно (в 2 раза) выше, чем в клетках, экспрессирующих хантингтин с длиной тракта 15 остатков глутамина (что является нормой), и в интактных клетках MSN. Важными участниками регуляции депоуправляемого кальциевого входа в клетках являются каналобразующий белок TRPC1 и белок STIM1 — сенсор кальция в люмене эндоплазматического ретикула. Для того чтобы исследовать роль STIM1 и TRPC1 в поддержании депоуправляемого входа в клетках MSN-138Q, мы подавили экспрессию их генов в этих клетках с помощью малых интерферирующих РНК. Регистрация депоуправляемых токов показала, что в нейронах MSN-138Q, моделирующих БХ, депоуправляемый вход кальция в условиях супрессии белков STIM1 и TRPC1 снижался, примерно на 60—70%. Таким образом, полученные нами данные демонстрируют, что депоуправляемый вход кальция в нейроны поддерживается каналами,

несущими в качестве субъединицы белок TRPC1, и требует присутствия сенсора кальция в эндоплазматическом ретикулеуме, белка STIM1.

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

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

Желточный синцитиальный слой (ЖСС) зародышей и личинок Teleostei — это провизорная структура, формирующаяся на стадии бластулы и выполняющая трофическую (метаболизм желтка) и морфогенетическую функции, а также являющаяся местом синтеза веществ, участвующих в реакциях врожденного иммунитета. Ультраструктура ЖСС изучена лишь у небольшого количества видов Костистых рыб, особенности ЖСС *Danio rerio* мало изучены. Известно, что в ходе личиночного развития Костистых рыб усвоение желтка идет наиболее активно. Цель этой работы — описание ультраструктуры ЖСС личинок *D. rerio* в возрасте 4—5 сут после оплодотворения методом трансмиссионной электронной микроскопии. В ходе личиночного периода, на 4—5-й день после оплодотворения, у разных индивидов даже из одной партии икры наблюдается разная скорость утилизации желтка и последующих процессов. ЖСС личинок *D. rerio* во время наиболее интенсивной утилизации желтка не стратифицирован по распределению органелл в отличие от ЖСС некоторых других видов Teleostei, хотя митохондрии преимущественно располагаются апикально. Ультраструктурные характеристики ЖСС различаются вдоль дорсовентральной оси, что, по-видимому, отражает различия в их функциональной нагрузке. У личинок со значительным объемом желтка в утолщенных дорсолатеральных областях ЖСС содержится наибольшее количество желточных включений, встречаются митохондрии неправильной формы. Наиболее характерная форма митохондрий ЖСС *D. rerio* эллиптическая, встречаются также изогнутые, грушевидные, гантелеобразные митохондрии. В дорсальной и дорсолатеральной областях митохондрии могут быть ориентированы как перпендикулярно, так и параллельно поверхности ЖСС, тогда как в латеральных областях ЖСС они преимущественно располагаются параллельно поверхности. Размеры митохондрий варьируют. Дорсально ЖСС тоньше, чем в других участках, с ним контактируют крупные пластинки желтка. Митохондрии и ядра различных размеров и формы окружены шЭПР. Микроворсинки апикальной поверхности ЖСС наиболее густо расположены дорсально и дорсолатерально. В ходе дальнейшего развития уменьшается объем желтка. ЖСС утолщается, увеличивается зона лизиса желтка (базальная, обращенная к желтку область ЖСС, содержащая наибольшее количество желточных включений). В это время она наиболее выражена в вентральной области. В цитоплазме ЖСС возрастает количество гомогенных и гетерогенных включений — это желточные включения на различных стадиях их переработки. Их многообразие было описано нами в предыдущей работе. Цитоплазма ЖСС окружает крупные фрагменты желт-

ка. Удлиняются микроворсинки. Все это — многочисленные митохондрии, крупные со светлой кариоплазмой ядра сложной формы и большое количество включений — свидетельствует об активной работе ЖСС. ЖСС представляет собой сложно организованную систему, выполняющую важнейшие функции в развитии Teleostei, и исследование его структуры и функционирования необходимо для понимания биологии провизорных систем.

ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ ВИМЕНТИНОВЫХ ФИЛАМЕНТОВ И МОРФОЛОГИИ СОСУДИСТЫХ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК В НОРМЕ И ПРИ АНЕВРИЗМЕ АОРТЫ. © А. Б. Малашичева, Е. А. Кондакова. Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, и С.-Петербургский государственный университет, 23eak@mail.ru

Известно, что аневризмы аорты у пациентов с бicuspidальным аортальным клапаном (БАК) и трикуспидальным аортальным клапаном (ТАК) различаются по гистологическим особенностям, метаболизму и экспрессии ряда генов (Blunder et al., 2012; Kjellqvist et al., 2013). В норме *in vivo* сосудистые гладкомышечные клетки находятся в дифференцированном состоянии и характеризуются «сократимым» фенотипом, а при сосудистых патологиях фенотип клеток меняется на «синтетический»; в частности, было показано, что при аневризме грудного отдела аорты (с ТАК) в них увеличивается количество виментина (Branchetti et al., 2013; Kjellqvist et al., 2013). При культивировании сосудистых гладкомышечных клеток также происходит изменение фенотипа с «сократимого» на «синтетический» (Worth et al., 2001).

Цель данной работы — сравнительная характеристика виментиновых промежуточных филаментов и особенностей морфологии гладкомышечных клеток аорты в норме, у пациентов с аневризмой аорты и БАК, а также с аневризмой аорты и ТАК.

Был изучен материал, полученный от 18 лиц: 7 из них с аневризмой аорты и БАК, 1 — с БАК и пограничным расширением, 3 — с аневризмой аорты и ТАК и 7 здоровых доноров. Клетки фиксировали на стеклах с помощью 4%-ного раствора параформальдегида и проводили иммуноцитохимическое окрашивание.

Для клеток пациентов с аневризмой аорты характерно менее упорядоченное, чем у клеток доноров, расположение виментиновых филаментов уже на 1-м пассаже. Для клеток пациентов характерно образование отростков, в том числе раздвоенных и ветвящихся. Клетки пациентов с БАК на 2-м и 3-м пассажах в среднем крупнее клеток доноров и пациентов с аневризмой аорты и ТАК. Крупные и(или) двуядерные клетки, клетки с отростками, а также клетки с дезорганизованным виментиновым цитоскелетом встречаются и среди донорских клеток уже на 2-м пассаже, причем их количество увеличивается со временем, однако их меньше, чем среди клеток пациентов с БАК. Клетки доноров и пациентов с ТАК способны сохранять сократимый фенотип до 4-го пассажа включительно. Среди клеток пациентов с аневризмой аорты и БАК на 3-м пассаже встречаются клетки сократимого фенотипа. Различие между культурами клеток пациентов с БАК и культурами клеток доноров и пациентов с ТАК состоит в соотношении количеств клеток «сократимого» и «синтетического» фенотипов. Полученные результаты

позволяют предположить, что фенотип гладкомышечных клеток аорты пациентов с аневризмой аорты и БАК при культивировании быстрее меняется с «сократимого» на «синтетический». Генетические основы указанных особенностей сосудистых гладкомышечных клеток требуют дальнейшего изучения.

NOTCH-ЗАВИСИМАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМНОГО ПЕРЕХОДА НАРУШЕНА В КЛЕТКАХ ПАЦИЕНТОВ С ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ АОРТАЛЬНОГО КЛАПАНА И АОРТЫ.

© А. С. Костина, А. Б. Малашичева. Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, и С.-Петербургский государственный университет, kosalek23@mail.ru

Эпителиально-мезенхимный переход и его разновидность — эндотелиально-мезенхимный переход (ЭМП) — это биологический процесс, при котором поляризованная эпителиальная или эндотелиальная клетка претерпевает множественные изменения и приобретает мезенхимный фенотип. Сигнальный путь Notch является ключевым в регуляции ЭМП в эндотелиальных клетках. Известно, что мутации в генах-компонентах каскада Notch связаны с рядом врожденных дефектов развития выходного тракта левого желудочка. В частности, показано, что мутации гена Notch1 связаны с врожденными аномалиями развития аортального клапана и аорты, однако механизмы реализации генетических мутаций по-прежнему остаются неясными. Мы предположили, что Notch-зависимая регуляция ЭМП нарушена в эндотелиальных клетках пациентов с врожденными пороками аортального клапана и аорты. В данной работе изучали индукцию ЭМП в эндотелиальных клетках аорты человека, а также в контрольных клетках пуповинной вены человека. Мы показали разницу в эффективности ЭМП в эндотелиальных клетках артериального и венозного происхождения в зависимости от природы индуктора. Лиганды рецептора Notch1, такие как Dll1 и Jag1, а также трансформирующий фактор роста TGFβ1 оказываются наиболее эффективными в отношении артериального эндотелия, в то время как внутриклеточный домен Notch1 (NICD) обеспечивает более эффективную индукцию ЭМП в эндотелиальных клетках венозного происхождения. Разница в степени ЭМП наиболее эффективно выявляется по экспрессии гена гладкомышечного актина — одного из основных маркеров ЭМП.

Затем мы сравнили способность к ЭМП эндотелия аорты здоровых доноров и клеток, полученных от пациентов с пороком развития аортального клапана. Для индукции ЭМП использовали две различные системы, одна из которых основана на сокультивировании клеток, вырабатывающих лиганды, и клеток, подвергающихся ЭМП. В другой системе запуск ЭМП происходил путем внесения лентивирусной конструкции с лигандом непосредственно в клетки, подвергающиеся переходу. Показано, что сокультивирование клеток, несущих лиганды, и клеток, в которых индуцируется ЭМП, оказывается более эффективным способом запуска ЭМП, нежели прямая индукция. Также было показано, что эндотелиальные клетки здоровых доноров эффективнее подвергаются ЭМП, чем эндотелий пациентов, имеющих пороки развития выносящего тракта аорты и(или) аортального клапана. Подробный анализ полученных данных показал, что практически все маркеры ЭМП, используемые в работе, являются эф-

фективными показателями степени трансформации, но в отношении различных индукторов. Так, гены SLUG и HEY экспрессируются при воздействии внутриклеточным доменом Notch1, гены SNAIL и FSPS100A4 проявляются при индукции лигандами Dll1 и Jag1, а HES маркирует ЭМП, индуцированный влиянием трансформирующего фактора роста TGFβ. Полученные данные свидетельствуют о том, что Notch-зависимая регуляция ЭМП нарушена в эндотелиальных клетках пациентов с врожденными пороками аортального клапана и аорты.

ГИСТОНОВЫЕ ДЕАЦЕТИЛАЗЫ SIRT1 И SIRT6 ПРИ ОДНОМ ИЗ СИНДРОМОВ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОГО СТАРЕНИЯ — АТАКСИИ-ТЕЛЕАНГИЭКТАЗИИ.

© М. Л. Куранова. С.-Петербургский государственный политехнический университет и Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, maryakuranova@gmail.com

Синдром атаксия-телеангиэктазия (АТ) является тяжелым наследственным нейродегенеративным заболеванием преждевременного старения, развивающимся при наличии мутаций в обоих аллелях гена *atm* (OMIM заболевания: 208900, OMIM гена *atm*: 607585). Ген локализован в 11-й хромосоме (11q23) (NC_000011.9 (108093559..108239829)), имеет размер 150 т. п. н. и содержит 66 экзонов (Savitsky et al., 1995; Lavin, Khanna, 1999; Pulverer, 2003), кодирует ключевой белок клеточного ответа на повреждение ДНК — протеинкиназу АТМ, являющуюся регулятором механизма клеточного ответа на повреждение ДНК и возникновение конформационных изменений хроматина. Для больших характерны патология центральной нервной системы, кожи, глаз, иммунологические нарушения, высокая предрасположенность к неоплазиям и прогероидные черты.

Как было показано многими группами ученых, в процессах старения и нейродегенерации важную роль осуществляют гистоновые деацетилазы — сиртуины, или SIRT-белки (Silent Information Regulators). В ходе старения, а также при повреждении ДНК может изменяться экспрессия генов, при этом сиртуины могут отсоединяться от локусов молчащих генов и перемещаться к поврежденным участкам ДНК, где способствуют их репарации.

Методом непрямой иммунофлуоресценции нами было исследовано содержание сиртуинов Sirt1 и Sirt6 в клетках от пациентов, страдающих синдромом преждевременного старения АТ: пациентки с тяжелой формой заболевания, более легкой (стертой) формой АТ и двух пациентов с мозаичной (более легкой) формой АТ. В качестве контроля была использована клеточная линия от здорового донора 8 лет. Клетки окрашивали антителами против мыши и кролика к белкам Sirt1 и Sirt6 соответственно (1 : 100, Cell Signaling), а затем анализировали среднюю интенсивность флуоресценции и диапазоны интенсивности флуоресценции (в усл. ед. флуоресценции). С каждого образца анализировали по 300 клеток. Измерение статистических данных производили в программе Excel.

В ходе работы нами было обнаружено, что в ядрах клеток больших АТ интенсивность флуоресценции деацетилазы SIRT6 достоверно выше, чем в клетках здорового донора. Каких-либо особенностей в интенсивности флуоресценции деацетилазы SIRT1 в ядрах клеток и активности протеинкиназы АТМ не выявлено. Интересным оказался разброс по диапазонам интенсивности флуоресцен-

ции: в двух линиях мозаичной (более легкой) формы АТ с выраженной гетерогенностью клеточной популяции. Ранее в этих двух клеточных линиях нами была описана гетерогенность популяций по количеству клеток, содержащих активную фосфорилированную форму киназы АТМ (что характерно для людей, не страдающих АТ) и не содержащих данных фокусов (что характерно для больных АТ). В этих двух линиях детектировались два пика интенсивности флуоресценции. Причем в зависимости от соотношения количества клеток с нормально функционирующей киназой АТМ и количества клеток без таковой величины пиков в диапазонах тоже оказались различными.

ПРОЦЕСС ПЕРЕНОСА НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПАТОЛОГИЙ МОЖЕТ БЫТЬ СВЯЗАН С ВЫХОДОМ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ВО ВНЕКЛЕТОЧНОЕ ПРОСТРАНСТВО. © В. Ф. Лазарев, А. Д. Никитина, Е. Р. Михайлова, И. В. Гужова, Б. А. Марзулис. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, vl.lazarev@gmail.com

Многие нейродегенеративные патологии традиционно связывают с появлением мутантных белков, которые формируют агрегаты в клетках мозга и в межклеточном пространстве. В последние годы был установлен факт перемещения таких белков от патогенных клеток к нормальным, характерного для прион-подобного распространения патологии. В то же время известно, что в формировании олигомеров и агрегатов помимо непосредственно мутантных белков могут принимать участие и другие клеточные белки. По нашим данным и данным из литературных источников, одним из полипептидов, принимающих активное участие в патогенном процессе при нейродегенеративных патологиях, является глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД). Этот фермент способен непосредственно взаимодействовать с такими патогенными белками, как мутантный хантингтин, СОД1, бета-амилоид и др. В то же время участие ГАФД в миграции мутантных белков, вызывающих гибель нейронов, совершенно не изучено. Целью нашей работы было исследование межклеточного транспорта ГАФД и сопровождающего это явление токсического эффекта.

В результате исследования эффекта оксидативного стресса на клетки нейробластомы человека SK-N-SH было установлено, что гибель клеток сопровождается появлением в ростовой среде ГАФД. Дальнейшие исследования на животных моделях болезней Альцгеймера и Хантингтона подтвердили выход ГАФД в спинномозговую жидкость. Эти данные побудили нас проверить способность ГАФД входить в другие клетки. По данным экспериментов на культуре первичных нейронов, меченая флуоресцентной меткой ГАФД способна проникать в клетку и даже формировать агрегаты в цитоплазме. Особенно следует отметить тот факт, что фермент способен проникать в нейроны совместно с бета-амилоидом и колокализироваться в агрегатах с патогенным полипептидом. Следующим этапом работ было изучение возможного цитотоксического действия ГАФД, оказавшегося во внеклеточном пространстве. Используя метод определения активности лактатдегидрогеназы в культуральной среде, мы установили, что ГАФД сам по себе, так же как и бета-амилоид и рекомбинантный фрагмент мутантного хантингтина, токсичен. Более того, ГАФД,

вступая в комплекс с патогенными белками, усиливает их токсичность.

Сравнивая представленные здесь результаты с данными, полученными ранее нами и другими коллективами, мы можем сделать вывод о том, что ГАФД принимает участие в различных этапах патогенного процесса при нейродегенерации. Он способен непосредственно взаимодействовать с мономерами и олигомерами мутантных белков, формируя при этом токсичные агрегаты. Перемещение ГАФД в межклеточное пространство также способствует гибели нервных клеток и распространению нейродегенерации. Наши результаты демонстрируют исключительную значимость ГАФД при развитии и распространении некоторых патологий и перспективы фермента в качестве новой мишени для терапии социально значимых заболеваний.

РЕГИОНАЛЬНАЯ ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК АОРТЫ КРЫСЫ. © К. А. Левчук, А. Б. Малашичева. Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, и С.-Петербургский государственный университет, ksenialevchuk@mail.ru

Аорта в традиционном понимании является эластической артерией, состоящей из внутреннего слоя (t. intima), представленного клетками эндотелия, наружного слоя (t. adventitia), представленного рыхлой волокнистой соединительной тканью, и мощно развитого среднего слоя (t. media), состоящего из циркулярно расположенных гладкомышечных клеток, окруженных волокнами коллагена и особыми структурами — окончатями эластическими мембранами, придающими аорте способность противостоять давлению тока крови, выбрасываемого из сердца. В последнее время внимание исследователей сосредоточено на фактах региональной гетерогенности клеточного состава аорты. Прослеживание судьбы клеток методами генетического маркирования свидетельствует о наличии зависимости ответа клеток на различные факторы от эмбрионального происхождения различных участков аорты. Таким образом, это стирает привычное восприятие аорты как сосуда с одинаковыми свойствами клеток по всей длине. Региональная функциональная гетерогенность клеток присуща по меньшей мере трем участкам, однако разные источники предоставляют информацию о двух и даже четырех.

В данной работе были выбраны три участка аорты линейных крыс: восходящая грудная аорта — происходит из клеточного гребня, нисходящая грудная аорта — происходит из сомитов, брюшная аорта — происходит из спланхической мезодермы. Задача работы — характеристика и сравнение между собой популяций гладкомышечных клеток, входящих в состав стенки аорты, в ее областях, различных по эмбриональному происхождению. Для исследования пролиферативных способностей были построены кривые роста гладкомышечных клеток, выделенных из разных участков аорты линейных крыс. Более интенсивно пролиферируют клетки восходящего отдела аорты по сравнению с клетками нисходящей грудной аорты. Для изучения функционирования сигнального пути TGF-beta и доказательства его значимости для разных популяций клеток аорты использовали метод Вестерн-блоттинга с предшествующей индукцией конфлюэнтных клеток этим фактором. Наблюдались различия

в уровнях содержания белков-маркеров: гладкомышечного актина, гладкомышечного 22 альфа, виментина между контрольными пробами и индуцированными трансформирующим фактором. Помимо этого, для характеристики функциональной гетерогенности непосредственно в ткани на протяжении аорты был проанализирован уровень сократительных белков, характерных для гладкомышечных клеток аорты. Уровень гладкомышечного актина и SM22 альфа значительно меньше в области восходящего грудного отдела, а выше всего — в области бифуркации. Уровень виментина, по полученным данным, приблизительно одинаков на всем протяжении аорты. Таким образом, гладкомышечные клетки аорты крысы обладают различными функциональными свойствами в зависимости от их эмбрионального происхождения.

ИСКУССТВЕННЫЕ ХРОМОСОМЫ ЧЕЛОВЕКА: НОВЫЙ ПОДХОД К ТРАНСГЕНЕЗУ. © М. А. Лисковских,¹ Н. Куприна,² В. Ларионов,² С. В. Пономарцев,¹ Е. Попова,³ М. Бадер,³ Н. В. Алена,³ А. Н. Томили.¹ ¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия, ²Национальный институт здоровья, Национальный институт рака, Бетезда, США, и ³Центр молекулярной медицины им. Макса Дельбрюка, Берлин, Германия, liskovykh@mail.ru

Искусственные хромосомы (ИХ) уже на протяжении более чем 20 лет рассматриваются как перспективная альтернатива другим векторным системам, таким как вирусная и трансгенная. ИХ обладают практически неограниченной емкостью и способны стабильно поддерживаться в виде отдельных хромосом, тем самым не несут в себе риска инсерционного мутагенеза. Тем не менее до последнего времени ИХ не получали широкого распространения ввиду неопределенности состава и неуправляемости. Ситуация в корне изменилась недавно, когда был предложен способ создания ИХ *de novo* на основе известных ДНК-последовательностей. В докладе обсуждаются перспективы использования этих векторов в тканезамещении и генотерапии заболеваний человека.

Плюрипотентные стволовые клетки, такие как эмбриональные или индуцированные плюрипотентные, представляют собой идеальный вектор для доставки ИХ посредством тканезамещения. Плюрипотентные стволовые клетки представляют интерес в контексте использования ИХ из-за своих уникальных свойств: они обладают практически неограниченным потенциалом самовоспроизводимости, а также дифференцировочным потенциалом. В докладе будет подробно освещена принципиальная возможность получения эмбриональных стволовых клеток, несущих ИХ в своем геноме. Полученные эмбриональные стволовые клетки, несущие ИХ в своем геноме, обладали всеми свойствами плюрипотентных стволовых клеток, что было подтверждено при помощи окраски на основные маркеры плюрипотентного состояния (Oct4, Nanog и SSEA1), теста на формирование тератом с последующим гистологическим анализом. Автономность и стабильность ИХ были подтверждены методом FISH-анализа.

Следующим не менее важным аспектом доклада является возможность создания химерного организма при инъекции вышеописанных клеток в бластоцисты мышей-реципиентов. В первую очередь интересно само по себе создание такого организма, так как будет подтверждена возможность использования полностью синтетиче-

ского генетического элемента в экспериментах по трансгенезу, что в свою очередь представляет не только практический, но и фундаментальный интерес.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта International Academy of Life Science (IALS), гранта Boehringer Ingelheim Fonds (BIF), DAAD (A/12/87445), стипендии президента РФ для молодых ученых (СП-3805.2013.4), ГК 8850 от 14.11.2012, Программы МКБ, финансирования и в рамках развития Центра исследования стволовых клеток при Сколковском институте науки и технологии (Сколтехе).

ИЗМЕНЕНИЯ СИНТЕЗА КОМПОНЕНТОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА В РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ. © О. А. Миленина, И. В. Воронкина, И. И. Ермакова, Н. М. Юдинцева. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ollimils@gmail.com

Регенеративная медицина — одна из ведущих областей современной медицины. Ее цель — восстановление структуры и функций поврежденных тканей путем трансплантации выращенных *in vitro* клеток. Клетки дермы и комплексы клеток с компонентами внеклеточного матрикса (ВКМ) используются как тканевые заместители. Основные клетки дермы — фибробласты — продуцируют большинство компонентов ВКМ в процессе регенерации кожи после повреждения. Доля разных молекул ВКМ широко варьирует в зависимости от типа ткани. Также состав окружающего клетки ВКМ зависит от условий культивирования, непосредственно влияющих на клеточную адгезию, пролиферацию и дифференцировку. Изучение состава и структуры ВКМ, синтезируемого фибробластами дермы человека в разных условиях культивирования, важно для создания клеточных продуктов на их основе.

Цель данной работы — исследование различий в составе и структуре ВКМ, синтезируемого фибробластами человека в разных условиях культивирования: в двухмерной (на твердой и мягкой подложках) и трехмерной системах.

В первой части работы были использованы фибробласты кожи человека, выделенные из нормальной и рубцовой тканей. Клетки на 4—5-м пассажах открепляли от поверхности культуральных чашек с помощью трипсин-версена и пересевали на пластиковые стекла (твердая подложка) и на поверхность перфтордекалина (мягкая подложка). Клетки культивировали 3 сут, затем осторожно удаляли перфтордекалин и фиксировали клетки на лежащих под ним стеклах. Препараты обрабатывали по методу непрямой иммунофлуоресценции, окрашивали три мажорных белка (коллаген I типа, ламинин и фибронектин), два гликозаминогликана (гиалуроновая кислота и хондроитинсульфат) и два протеогликана (декорин и версикан). Затем проводили качественную и количественную оценки готовых препаратов. Были обнаружены различия в интенсивности окрашивания компонентов ВКМ между клетками двух типов, различия в локализации, толщине и длине белковых фибрилл.

Известно, что актиновый цитоскелет быстро реагирует на какие-либо изменения в микроокружении клеток. По пространственной организации актинового цитоскелета можно оценить различия в синтетической активно-

сти клеток, культивируемых в разных условиях. Препараты окрашивали антителами на винкулин в сочетании с родамин-фаллоидином. Готовые препараты анализировали с помощью конфокального микроскопа.

Во второй части работы планируется провести аналогичные эксперименты с клетками, культивируемыми в 3D-системе.

По первой части работы получены следующие результаты. Разработаны методика культивирования дермальных фибробластов в двухфазной системе на поверхности перфтордекалина и метод подготовки препаратов для конфокальной микроскопии при таком культивировании. Обнаружены различия в микроокружении дермальных фибробластов, выделенных из рубцовой и нормальной тканей. Выявлены различия в организации цитоскелета и фокальных контактов при культивировании фибробластов в 2D-системе на подложках с разной адгезией.

ХАРАКТЕРИСТИКА УСЛОВИЙ ИНДУКЦИИ ПОВЕРХНОСТНОЙ ЭКСПРЕССИИ CD25 В Т-ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА И Т-КЛЕТКАХ JURKAT. © Е. В. Митюшова, И. И. Марахова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, elena-mityushova@yandex.ru

Экспрессия α -цепи рецептора интерлейкина-2 (ИЛ-2) и формирование полноценного рецептора ИЛ-2 являются решающим моментом в цепи событий, регулирующих пролиферацию и иммунный ответ Т-лимфоцитов. Нарушение механизмов, контролирующих экспрессию α -субъединицы в Т-лимфоцитах, лежит в основе аутоиммунных заболеваний. Целью данной работы было исследование механизмов, контролирующих поверхностную экспрессию α -цепи рецептора ИЛ-2 в нормальных лимфоцитах человека и трансформированных Т-клетках линии Jurkat. Об уровне экспрессии α -цепи рецептора ИЛ-2 судили по изменению численности клеток, экспонирующих маркер CD25 (методом проточной цитофлуориметрии). На лимфоцитах периферической крови человека, стимулированных к пролиферации фитогемагглютинином (ФГА), установлено, что при активации Т-лимфоцитов сигнал для запуска экспрессии ИЛ-2R α поступает с Т-рецепторного комплекса через Src-киназный сигнальный путь. На поздней же стадии пролиферативного ответа высокий уровень экспрессии CD25 должен регулироваться через рецептор ИЛ-2 с участием JAK-киназ, ассоциированных с этим рецептором, и JAK/STAT-сигнального пути. Показано, что длящаяся во времени высокая активность транскрипционного фактора STAT5 является необходимым условием поверхностной экспрессии CD25. WHI-P131, селективный ингибитор тирозинкиназы JAK3, препятствует появлению фосфорилированных форм STAT5 на всех сроках действия ФГА, отменяет экспрессию CD25, бласттрансформацию и запуск пролиферативного ответа, останавливая лимфоциты в фазе G₁. Установлено, что экзогенный ИЛ-2 индуцирует поверхностную экспрессию CD25 только в компетентных (но не в покоящихся) Т-лимфоцитах крови человека и одновременно повышает уровень активности STAT5. Обнаружено, что в растущих культурах трансформированных Т-клеток Jurkat в присутствии ФГА (5 мкг/мл) или ФГА с фоболовым эфиром появляются клетки, несущие CD25, численность которых через 1 сут составляет 25—70 % всей популяции Т-клеток. WHI-P131 тормозит рост клеточных культур Jurkat, вызывая остановку клеточного

цикла в фазе G₂/M. В ходе исследования влияния WHI-P131 на экспрессию CD25 было показано, что ингибитор снижает численность мелких клеток CD25+ в культуре трансформированных клеток, увеличивая численность крупных клеток CD25+. Последнее наблюдение объясняется возрастанием числа клеток с блоком клеточного цикла в фазе G₂/M. Выявлено повышение уровня активности STAT5 при индукции поверхностной экспрессии CD25 в клетках Jurkat. Сделан вывод о том, что JAK3/STAT5-путь сигнализации участвует в поддержании устойчивой во времени экспрессии альфа-цепи рецептора ИЛ-2 как в нормальных, так и в трансформированных Т-лимфоцитах.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (2013—2018 гг.), программы президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-4957.2012.4), федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры России» (2009—2011 гг.), Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-00234-а).

ТАНДЕМНЫЕ ПОВТОРЫ IN SILICO И IN SITU У ТРЕХ ВИДОВ РОДА MUS. © Д. И. Остромышенский. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, necroforus@gmail.com

Тандемноповторяющиеся последовательности (ТП) представляют собой уникальный для эукариот класс последовательностей ДНК. Уникальность свойств — следствие их структурной организации: они состоят из многократно тандемноповторяющихся («голова-к-хвосту») коротких последовательностей (мономеров). ТП есть только у эукариотических, но не прокариотических организмов. Их содержание в геноме у высших эукариот может достигать десятков процентов. ТП являются основными компонентами структурно значимых частей хромосом, таких как теломеры, центромеры и гетерохроматиновые районы. Функциональное значение и механизмы эволюции ТП в геномах эукариот остаются невыясненными. Причиной этого является ограниченный арсенал методов изучения ТП. Удобным объектом для изучения ТП и их эволюции является род *Mus*. Геном *M. musculus* отсеквенирован в 2003, постоянно совершенствуется, сравнительно хорошо собран, есть базы данных некартированных контигов. У *M. musculus* клонированы 2 центромерных и 2 перицентромерных ТП. Нами показано, что клонированные сатДНК *M. musculus* у *M. spicilegus* обнаружили сходный с исходным видом сигнал. Однако у *M. caroli* есть только перицентромерные ТП. Ранее в нашей лаборатории биоинформатическим анализом в полногеномной сборке генома мыши (WGS) выявлено 8 семейств ТП, состоящих из 62 подсемейств, из которых только 2 подсемейства описаны ранее как клонированные сатДНК (Komissarov et al., 2011). Мы сконструировали пробы к найденным ТП для проведения флуоресцентной гибридизации in situ (FISH). Показано, что ТП детектируются на большем количестве хромосом *M. musculus*, чем найдено в собранном эталонном геноме. Это связано с неполнотой геномной сборки. У близкородственного *M. musculus* вида *M. spicilegus* наблюдали схожий паттерн распределения сигналов; у более эволюционно далекого вида *M. caroli* детектировали только от-

дельные ТП на значительно меньшем числе хромосом; есть уникальные для вида ТП. Показано наличие ТП, детектируемых гибридизацией *in situ*, во фрагментарной базе данных генома *M. caroli* из Sequence Read Archive. Два клонированных ТП *M. caroli* не обнаружены у двух других исследованных видов. Таким образом, у рода *Mus* подтверждается видоспецифичность ТП: если близкородственные виды содержат сходный набор ТП, то более эволюционно далекий вид того же рода обладает собственным набором ТП.

ИЗУЧЕНИЕ БЕЛОК-БЕЛКОВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ Е3-УБИКВИТИН ЛИГАЗ COP1 И MDM2. © А. В. Петухов, О. Ю. Шувалов, Г. С. Иванов, О. А. Федорова, Н. А. Барлев. С.-Петербургский государственный технологический институт (Технический университет) и Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, alexeysakhalin@gmail.com

Изучение белок-белковых взаимодействий приобретает все большую актуальность в свете разработки новых противоопухолевых препаратов. Белок-онкосупрессор p53, контролирующий переход клеток из фазы G₁ в фазу S клеточного цикла, а также участвующий в активации апоптоза, часто мутирован или его экспрессия подавлена в раковых клетках. Соответственно его реактивация представляет собой один из наиболее перспективных подходов в контексте создания новых противоопухолевых низкомолекулярных препаратов. Однако реактивация нативного p53 затруднена тем, что белок быстро деградирует за счет убиквитинзависимой протеасомной деградации. Из специфических Е3-убиквитинлигаз, негативно регулирующих активность и стабильность p53, помимо MDM2, наибольший интерес представляют также Pirh2 и COP1. Важно отметить, что Е3-убиквитинлигаза COP1 кроме своей предполагаемой онкогенной функции выполняет также и онкосупрессорную функцию через регуляцию активности транскрипционного фактора c-Jun, таким образом опосредованно участвуя в клеточном ответе на ростовые факторы, оксидативный стресс, УФ-облучение и системное воспаление.

В данной работе был проведен структурно-функциональный анализ доменов белка COP1 на предмет его взаимодействия *in vitro* с другой p53-специфической Е3-убиквитинлигазой, MDM2. Для изучения этих взаимодействий, с одной стороны, нами была произведена трансфекция клеток экспрессионными эукариотическими векторами pIRES-hrGFP-1a, содержащими последовательности, кодирующие белок COP1 и его делеционные варианты (ΔRING, ΔWD40 и ΔccWD40). Для трансфекции использовали опухолевые линии, различающиеся по p53 статусу, H1299 (p53⁻) и U2OS (p53⁺). С другой стороны, нами были выделены из *E. coli* и аффинно очищены рекомбинантный белок MDM2 и его делеционные варианты (1-491, 1-332, 61-491 и 237-288), слитые с GST. Белок-белковые взаимодействия между GST-MDM2 и COP1 изучали с помощью инкубации очищенных рекомбинантных белков с клеточными экстрактами трансфицированных линий и последующего Вестерн-блоттинга. Мы подтвердили ранее опубликованные данные о физическом взаимодействии Е3-убиквитинлигаз MDM2 и COP1, а также о локализации различных делеционных вариантов COP1 в клеточных компартментах. Кроме того, была изучена роль coiled-coil домена COP1 во взаимодействии

с MDM2 и высказано предположение о возможности сохранения p53-убиквитинилирующей активности MDM2 после его стабилизации COP1 через белок-белковые взаимодействия.

Результаты данной работы в будущем позволят разработать рациональные подходы к созданию ингибиторов взаимодействия COP1-MDM2 для применения в противораковой терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта правительства Российской Федерации № 11.G34.31.0069 от 21.10.2011 и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-01024 А).

АКТИН — ГЛОБУЛЯРНЫЙ ИЛИ ВНУТРЕННЕ НЕУПОРЯДОЧЕННЫЙ БЕЛОК? © О. И. Поварова,¹ К. К. Турочеров,^{1,2} И. М. Кузнецова.^{1,2} ¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург и ² С.-Петербургский государственный политехнический университет, olp@incras.ru

В течение длительного времени считалось, что функция белка зависит от сворачивания его в уникальную нативную трехмерную структуру. За последние 15 лет накопились данные, свидетельствующие о том, что многие белки могут выполнять свою функцию, будучи частично или полностью неупорядоченными. В настоящее время эти белки называют «внутренне неупорядоченными» (intrinsically disordered proteins). Основными отличительными особенностями таких белков являются неспособность формировать кристаллы, низкий сигнал кругового дихроизма в дальней и ближней УФ-областях спектра, большие гидродинамические размеры и подверженность протеолизу. Способность внутренне неупорядоченных белков формировать комплекс со своими партнерами лежит в основе функционирования этих белков — специфическом узнавании партнеров (лигандов, других белков, нуклеиновых кислот и т. д.), образовании с ними комплексов и участии за счет этого в передаче сигналов, контроле и регуляции различных внутриклеточных процессов. Хотя многие белки вовлечены в эти процессы, особое внимание уделяется главным регуляторным белкам, которые играют ключевую роль в регуляции этих сложных процессов, являющимся фактически их «дирижерами» и получившим в литературе название хабов (hubs) — сетевых концентраторов. Многие из этих белков являются внутренне неупорядоченными. К числу таких белков относятся, например, синуклеин, белок p53, белки HMG и ряд других. К внутренне неупорядоченным белкам, с нашей точки зрения, может быть отнесен и актин, хотя до сих пор его принято было считать глобулярным. Действительно, актин, как и другие внутренне неупорядоченные белки, не может свернуться в трехмерную структуру без участия шаперонов. Кроме шаперонов в фолдинге актина необходимы лиганды — кальций и АТФ. Разворачивание актина *in vitro* является необратимым процессом, это значит, что информации о структуре белка, закодированной в его аминокислотной последовательности, недостаточно для формирования трехмерной структуры. Актин всегда существует в комплексе: во время фолдинга полипептидная цепь актина сначала взаимодействует с Hsp70, затем с префолдином и, наконец, с шаперонином ССТ; фибриллярный актин образован за счет самоассоциации молекул глобулярного актина; в цитоплазме или ядре глобулярный актин находится в комплексе с актинсвязывающими

белками. Как и другие внутренне неупорядоченные белки, актин взаимодействует с большим количеством партнеров. Взаимодействуя с многочисленными актинсвязывающими белками, актин выступает в роли белка-хаба, что характерно для внутренне неупорядоченных белков. Актин многофункционален и вездесущ. Он является одним из основных компонентов системы мышечного сокращения, формирует цитоскелет клетки, обнаружен в ядре клетки, где наряду с функциями, которые он выполняет в цитоплазме, формируя цитоскелет, он также выступает в качестве регуляторного белка, участвующего в процессах транскрипции и ремодуляции хроматина.

МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ СФЕРОПЛАСТОВ ДИНОФЛАГЕЛЛЯТ *PROROCENTRUM MINIMUM*, ПРИГОДНЫХ ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ ИОННЫХ КАНАЛОВ.
© И. А. Поздняков. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, pozdnakov@cytspb.rssi.ru

Метод локальной фиксации потенциала на мембране (patch clamp) уже несколько десятилетий является мощным инструментом для изучения ионных каналов, однако он используется главным образом при работе с клетками животных и высших растений. Применение этого метода к клеткам других групп эукариот все еще остается нетривиальной задачей. Главными проблемами при применении метода локальной фиксации потенциала к эукариотическим микроорганизмам являются подвижность клеток и наличие сложных клеточных покровов, препятствующих образованию плотного контакта между регистрирующей микропипеткой и плазматической мембраной. Решение этих проблем особенно актуально для армированных динофлагеллят, чьи многослойные клеточные покровы включают в себя жесткий слой содержащих целлюлозу текальных пластин, расположенных под плазматической мембраной. В ходе выполнения настоящей работы был разработан метод, позволяющий получать сферопласты из клеток динофлагеллят *Prorocentrum minimum*, которые пригодны для электрофизиологических исследований. Метод основан на индуцировании экдизиса (сброса клеточных покровов) у *P. minimum* в сочетании с ингибированием синтеза целлюлозы 2,6-дихлорбензонитрилом (ДХБ). Мы показали, что ДХБ в концентрациях выше 50 мкМ не только ингибирует синтез целлюлозы у *P. minimum*, но и является индуктором экдизиса, не менее эффективным, чем иные протестированные нами факторы. При этом процент экдизирующих клеток зависит от фазы роста культуры на момент воздействия ДХБ и всегда в несколько раз превышает уровень экдизиса в контроле. Полученные таким образом сферопласты способны образовывать плотный контакт с регистрирующей микропипеткой (сопротивление более 1 ГОм) в 40 % случаев. Данный подход позволил нам впервые получить записи одиночных каналов динофлагеллят. Зарегистрированные нами каналы обладают катионной селективностью и сравнительно высокой проводимостью (87 и 54 пСм).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 12-04-31952-мол_a и 13-04-00703-a).

РОЛЬ БЕЛКА DDX5 В СБОРКЕ ЯДЕРНЫХ СТРЕСС-ТЕЛЕЦ ПРИ ТЕПЛОМ СТРЕССЕ. © Н. В. Поно-

марцев, Н. И. Енукашвили. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ponomartsev@yandex.ru

Одним из интереснейших свойств живых организмов является ответ клеток на изменения окружающей среды. Все организмы в течение всей своей жизни подвергаются различным стрессовым воздействиям. Для поддержания жизни в организмах сформировались адаптивные механизмы, запускающиеся в ответ на то или иное воздействие. Одним из основных звеньев различных механизмов ответа клетки на стресс является активация фактора теплового шока-1 (HSF-1). Его активация приводит к транскрипции генов белков теплового шока. Гранулы HSF-1 обнаружены в прицентромерных гетерохроматиновых районах определенных хромосом, где этот белок участвует в формировании ядерных стресс-телец (ЯСТ). ЯСТ представляют собой рибонуклеопротеиновые структуры, которые включают в себя различные факторы сплайсинга и другие РНК-связывающие белки. На сегодня роль ЯСТ в ответе клетки на стресс слабо изучена. Предполагается, что они участвуют в репрограммировании генной экспрессии во время стресса. Помимо этого, известно, что стрессиндуцированное связывание HSF-1 с прицентромерными районами хромосом сопровождается активацией транскрипции прицентромерной сателлитной ДНК3 человека (HS3), транскрипты которой также участвует в формировании ЯСТ. Долгое время считалось, что сателлитная ДНК не транскрибируется. На сегодня существует большое количество работ, доказывающих транскрипционную активность сателлитной ДНК, однако механизмы и участники активации такой транскрипции мало изучены. Одним из предполагаемых участников активации транскрипции HS3 является белок DDX5, относящийся к семейству DEAD-боксоносителей РНК-хеликаз. Показано, что он связывается с HS3 и колокализуется с ним во время его транскрипции. Мы предположили, что белок DDX5 вовлекается в ответ клетки на тепловой стресс, активируя транскрипцию HS3 и участвуя в сборке ЯСТ. В работе мы использовали человеческую клеточную линию U937. Клетки подвергали тепловому воздействию в течение 1 ч при 43 °С. Мы оценивали динамику транскрипции HS3 и гена *ddx5* с помощью методов ОТ-ПЦР. Динамику экспрессии белка DDX5 анализировали с помощью методов иммуноцитохимии и проточной цитометрии. Также мы провели инактивацию белка DDX5 методом трансфекции клеток siРНК, инактивирующей мРНК *ddx5*, и оценили влияние инактивации DDX5 на транскрипцию HS3 и сборку ЯСТ, маркером которых является белок HSF-1, иммуноцитохимическими методами и последующей конфокальной микроскопией. Нами показано, что увеличение концентрации белка DDX5 и транскриптов HS3 происходит в первые 15 мин теплового воздействия. Также показано, что сразу после 1 ч теплового воздействия и в течение 2 ч после него белок DDX5 образует гранулы в ядрах клеток, которые перекрываются полностью или частично с гранулами HSF-1. Инактивация белка DDX5 в наших экспериментах приводила к снижению концентрации транскрипта HS3. Также в клетках с инактивированным DDX5 не наблюдалось сборки ЯСТ, определяемой по образованию гранул HSF-1. Таким образом, согласно нашим данным, белок DDX5 участвует в ответе клетки на тепловой стресс, участвуя в транскрипции HS3 и в стрессиндуцируемой сборке ЯСТ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 11-04-01676а и 11-04-01639а).

ПРИМЕНЕНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ХРОМОСОМЫ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ТЯЖЕЛОГО КОМБИНИРОВАННОГО ИММУНОДЕФИЦИТА НА ПРИМЕРЕ МУТАНТНЫХ МЫШЕЙ. © С. В. Пономарцев, М. А. Лисковых, А. Н. Томилин. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ponomartsevsv@gmail.com

Искусственная хромосома человека (ИХЧ) — удобный вектор для доставки генов в клетку. По сравнению с другими векторными системами, такими как вирусные, ИХЧ обладает рядом преимуществ, среди которых неизменяемость в геноме, возможность переноса генетических конструкций большой длины и стабильность в геноме клетки хозяина.

Мы поставили перед собой задачу проверить возможность использования ИХЧ в генотерапии. Модельный объект, выбранный нами, иммунодефицитные мыши, мутантные по гену *IL2rg* (ген гамма-субъединицы рецептора к интерлейкину 2). Для мышей, мутантных по данному гену, отмечены недоразвитие тимуса, отсутствие или крайне малое количество Т- и В-клеток, а также полное отсутствие NK (natural killer) клеток. У человека мутации в гене *IL2rg* приводят к таким же последствиям и являются одной из причин синдрома тяжелого комбинированного иммунодефицита, который возникает примерно у 1 из 100 000 новорожденных. В наши цели входят получение индуцированных плюрипотентных клеток мутантных мышей, несущих в своем геноме ИХЧ с нормальным геном *IL2rg*, введение полученных клеток в организм больных мышей и оценка эффективности данного подхода в устранении симптомов тяжелого комбинированного иммунодефицита.

СНО-клетки, несущие в своем геноме ИХЧ, синтезированную в лаборатории Владимира Ларионова (Laboratories of Molecular Pharmacology, National Cancer Institute, Bethesda, MD, США), были предоставлены нам в рамках научного сотрудничества.

На сегодняшний день нами получены следующие результаты.

1. С помощью стандартных методов клонирования получены вектор 5760, несущий ген *IL2rg* и инсультаторы cHS4, и вектор 6160, в котором вместе с геном *IL2RG* присутствуют инсультаторы tRNA, которые, как было показано для СНО-клеток, обеспечивает высокую защиту экспрессии гена от эпигенетического глушения (Lee et al., 2013).

2. При использовании рекомбинации cre-lox нами получены клетки СНО, несущие в своем геноме ИХЧ со встроенным в нее вектором 5760. С помощью rtPCR у этих клеток показана экспрессия гена *IL2RG*, что говорит о том, что наша генетическая конструкция действительно работает и ген *IL2rg* находится в активном состоянии. Нами были отобраны 2 клон, для которых показано с помощью FISH-гибридизации на метафазных пластинках, что ИХЧ, несущая ген *IL2rg*, не интегрирована в геном, а является автономной.

Перечисленные результаты являются промежуточными. В конечном счете мы планируем получение iPC клеток *IL2rg* мутантных мышей, перенос в эти клетки наших генетических конструкций и введение полученных кле-

ток в организм больных мышей с генотерапевтическими целями.

Работа проводится при финансовой поддержке Фонда Сколково (грант «СколТех»).

РОЛЬ СОГЛАСОВАННОЙ СТИМУЛЯЦИИ СИСТЕМЫ НАТРИЙУРЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ И PPARG-СИГНАЛЬНОГО ПУТИ В РАЗВИТИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ ЖИРОВОЙ ТКАНИ КОСТНОГО МОЗГА. © А. В. Ревитцер, Р. И. Дмитриева. Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, ceytynet@gmail.com

Существует ряд заболеваний и физиологических состояний, при которых происходит замена функциональной ткани на жировую. При старении, сахарном диабете второго типа, ожирении, остеопорозе происходит замещение костной ткани на жировую, обусловленное нарушениями в согласованных механизмах обновления клеток костной ткани (остеоцитов, остеобластов и адипоцитов) из мультипотентных стромальных клеток костного мозга (ММСК). Молекулярные механизмы этих нарушений остаются нераскрытыми, и целью нашей работы являлось исследование механизмов взаимодействия сигнальных путей, которые регулируются PPARg, с системой натрийуретических пептидов. PPARg-рецепторы являются центральными регуляторами энергетического гомеостаза, метаболизма глюкозы и липидов, динамики экспрессии дифференциации адипоцитов, что обуславливает перспективность их дальнейших исследований. Система натрийуретических пептидов также участвует в регуляции метаболизма жировой ткани. Методы. ММСК получали по стандартным методикам. Протоколы дифференцировки были оптимизированы с целью повышения эффективности. Динамику экспрессии оценивали ПЦР в реальном времени и иммуноцитохимическими методами. Оценивали базальный уровень (D0), уровень через 7 дней после стимуляции (D7) и уровень через 11 дней после стимуляции (D11). Экспрессионные данные показаны в условных единицах. Результаты. В ходе адипогенной дифференцировки ММСК *in vitro* была показана согласованная динамика экспрессии комплекса PPARg/Pgc1a. PPARg: D0 4+1.5; D7 493+205; D11 384+92. Pgc1a: D0 11.6+4.5; D7 235+160; D11 90+45. Также похожим образом выглядела и динамика экспрессии маркера бурой жировой ткани Ucp1 : D0 6+2; D7 17+4.7; D11 12+3. Исследование динамики экспрессии регуляторного рецептора системы натрийуретических пептидов NPRA и клиранс-рецептора NPRC в ходе дифференцировки также продемонстрировало согласованную регуляцию экспрессии системы в ходе дифференцировки: NPRA: D0 37+16; D7 7446+2427; D11 5680+1870; NPRC: D0 9+5; D7 12+5; D11 8+2. Преимущественная стимуляция NPRA свидетельствует о том, что активность системы натрийуретических пептидов возрастает в ходе созревания жировой ткани. Обработка зрелых адипоцитов агонистом PPARg рецептора розиглитазона (2 мкм, 16 ч) вызвала пятикратную стимуляцию экспрессии NPRA, что свидетельствует о возможности согласованной стимуляции системы натрийуретических пептидов и PPARg-сигнального пути в развитии и дифференцировке жировой ткани костного мозга.

Экспрессия маркеров бурой жировой ткани (Pgc1a и Ucp1) на всех этапах адипогенной дифференцировки по-

казывает, что выбранная модель может эффективно отражать смешанный фенотип жировой ткани костного мозга, которая имеет признаки как белой, так и бурой жировой ткани. Дальнейшее исследование взаимодействий этих сигнальных путей может выявить новые терапевтические мишени при заболеваниях, обусловленных нарушениями в согласованных механизмах обновления клеток костной ткани.

БИОМАРКЕРЫ ВИРУСНЫХ МИОКАРДИТОВ: ВЫБОР РЕФЕРЕНТНЫХ ГЕНОВ ДЛЯ АНАЛИЗА ТРАНСКРИПЦИИ. © А. Л. Рунов,¹ А. Д. Григорьева,² А. Г. Миттенберг,¹ М. С. Вонский.¹ ¹Институт цитологии РАН и Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, tsinakan@gmail.com

Миокардит определяют как воспалительный процесс в сердечной мышце. Заболевания сердечно-сосудистой системы являются главной причиной смерти людей в развитых странах. Дифференциальная диагностика миокардита до сих пор остается сложной, но востребованной задачей.

Воспалительный процесс сопровождается изменениями в экспрессии генов в клетках организма, а уровни содержания мРНК могут быть использованы в качестве биомаркеров патологии. Анализ литературных данных позволяет нам предположить, что развитие миокардита приводит к изменениям экспрессии генов не только в затронутых воспалительным процессом тканях сердца, но и в том числе в клетках крови. Для достоверной оценки изменений в содержании мРНК важен выбор референтных генов, экспрессия которых не зависит от развития заболевания. Задачей данной работы был выбор генов, экспрессия которых не меняется в клетках человека при миокардите.

В качестве кандидатов в референтные гены для нормирования экспрессии было отобрано 6 конститутивно экспрессирующихся генов «домашнего хозяйства», слабо реагирующих на большинство внешних воздействий: гены глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH), бета-актина (ACTB), гипоксантин гуанин фосфорибозилтрансферазы (HPRT1), гидроксиметилбилансинтазы (HMBS), рибосомального белка L5 (RPL5) и бета-2 микроглобулина (B2M). Экспрессию генов оценивали по содержанию соответствующих мРНК методом ПЦР в реальном времени после обратной транскрипции (ОТ-ПЦР-РВ). Системы праймеров были сконструированы с учетом экзон-интронной структуры, чтобы исключить амплификацию геномной ДНК. После оптимизации условий проведения ОТ-ПЦР было показано формирование специфического продукта на матрице кДНК, тогда как на геномной ДНК амплификация не происходила.

Препараты мРНК выделяли из лейкоцитов пациентов с различными формами кардиомиопатий (20 образцов) и лейкоцитов здоровых доноров (20 образцов). При получении лейкоцитарной массы особое внимание уделяли предотвращению деградации РНК. мРНК выделяли из лейкоцитарной массы методом фенольной экстракции. Чистоту и концентрацию выделенной РНК определяли спектрофотометрически. Целостность мРНК оценивали с помощью электрофореза в денатурирующем геле.

После проведения ОТ-ПЦР-РВ данные анализировали с использованием свободно распространяемых про-

граммных пакетов geNorm, NormFinder и BestKeeper. Сопоставление референтных генов, идентифицированных с помощью различных алгоритмов, позволяет выбрать их оптимальную комбинацию для нормализации результатов ОТ-ПЦР-РВ при исследовании изменений профилей экспрессии генов при миокардитах.

НАРУШЕНИЯ ПАМЯТИ, СВЯЗАННЫЕ С БОЛЕЗНЬЮ АЛЬЦГЕЙМЕРА, МОГУТ БЫТЬ ВЫЗВАНЫ ГИПЕРАКТИВНОСТЬЮ КАНАЛОВ ORAI. © М. А. Рязанцева,¹ А. А. Панова,² Е. В. Казначеева.¹ ¹Институт цитологии РАН и ²Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, mariaandreevna@gmail.com

Болезнь Альцгеймера — нейродегенеративное заболевание, которое сопровождается серьезными нарушениями памяти. До 50 % случаев наследственной болезни Альцгеймера (НБА) связаны с мутациями в гене белка пресенилин-1 (PS1). Белок PS1 после прохождения эндопротеолиза становится активным компонентом ферментативного комплекса гамма-секретазы. Ранее было показано, что мутации в гене белка PS1 могут приводить к нарушению регуляции кальциевого гомеостаза в нейронах, в том числе к нарушениям активности депоуправляемых кальциевых каналов. Однако роль ферментативной активности белка PS1 в данных нарушениях не была изучена. Депоуправляемые кальциевые каналы вовлечены в регуляцию ключевых процессов в нейронах, таких как долговременная потенциация и выброс нейромедиатора. С помощью лентивирусной трансдукции мутантных генов PS1 нами были созданы клеточные модели НБА на основе нейробластомы мыши Neuro2a и первичной культуры нейронов гиппокампа мышей. В качестве контроля использовали трансдукцию PS1 дикого типа. Уровень эндопротеолиза мутантных белков отслеживали с помощью SDS-PAGE-электрофореза тотальных лизатов и Вестерн-блота. Было обнаружено, что у ряда мутантов, связанных с НБА, происходит нарушение прохождения эндопротеолиза с последующим накоплением полноразмерного белка. Также прохождение эндопротеолиза замедляли с помощью фармакологических ингибиторов активности гамма-секретазного комплекса. Подобное накопление полноразмерного белка PS1 показано ранее в тканях головного мозга пациентов с НБА. С помощью метода локальной фиксации потенциала и измерения внутриклеточной концентрации кальция с флуоресцентным зондом Fura2-AM было обнаружено, что фармакологическое ингибирование, нарушающее эндопротеолиз, или экспрессия мутанта с полной потерей ферментативной активности, приводило к увеличению активности депоуправляемых кальциевых каналов Orai1. Экспрессия контрольного PS1 дикого типа приводила к увеличению количества белка, прошедшего эндопротеолиз, относительно количества полноразмерного белка PS1. Однако увеличение количества фрагмента PS1, входящего в комплекс гамма-секретазы, не оказывало влияния на активность депо-управляемых кальциевых каналов. Накопление человеческого белка PS1 в нейронах было смоделировано в трансгенной модели БА на основе *Drosophila melanogaster*. Самцы, моделирующие БА, показали развивающиеся с возрастом нарушения памяти в стандартизированных тестах, направленных на проверку памяти, основанных на стереотипном поведении. Кормление взрослых особей ингибиторами де-

поуправляемых кальциевых каналов устраняло патологический фенотип. Таким образом, нами впервые показано, что потеря ферментативной функции и накопление полноразмерного белка PS1, подобное тому, что обнаружено в тканях головного мозга пациентов с НБА, приводят к изменениям активности депоуправляемых кальциевых каналов в нейронах и могут быть причиной нарушения памяти.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-31280), Carl Zeiss («ОПТЭК»), Era.Net-Rus, программы МКБ и стипендии президента РФ (СП-2492.2013.4).

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ДИНАМИКИ ИНТЕРНАЛИЗАЦИИ РЕЦЕПТОРА ЭФР. © А. В. Салова, Т. Н. Беляева, Е. А. Леонтьева, Е. С. Корнилова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, avsalova@gmail.com

ЭФР-рецепторная система отвечает за пролиферацию, дифференцировку, выживание при апоптозе и клеточную подвижность. После связывания рецептора ЭФР с лигандом происходят стимуляция сигнальных каскадов и эндоцитоз ЭФР-рецепторных комплексов. В ходе этого процесса ЭФР-рецепторные комплексы попадают в ранние сортирующие эндосомы, откуда рецептор может рециркулировать или попадать в поздние эндосомы для последующей деградации в лизосомах. В настоящее время изучение начальных этапов эндоцитоза привлекает пристальное внимание, поскольку именно активация и интернализация рецептора запускают пролиферативные и антиапоптотические программы клеток. Эти исследования являются особенно актуальными, так как гиперэкспрессия рецептора ЭФР наблюдается в клетках опухолей эпителиального происхождения. В нашей работе для изучения динамики интернализации рецептора ЭФР применяли методы флуоресцентной конфокальной микроскопии. Работу проводили на клетках с разным уровнем гиперэкспрессии рецептора ЭФР — HeLa (+) и A431 (++) . Мы использовали традиционный метод визуализации рецептора ЭФР с помощью антител, а также метод выявления рецептора с применением флуоресцентно меченного ЭФР. Для этого в первом случае эндоцитоз стимулировали добавлением ЭФР с последующей фиксацией клеток и окраской антителами на рецептор; во втором случае эндоцитоз стимулировали добавлением ЭФР, меченного флуоресцентной меткой (путем присоединения биотинилированного ЭФР к конъюгированной со стрептавидином метке). В качестве флуоресцентной метки были выбраны полупроводниковые нанокристаллы — квантовые точки (КТ) и цианиновый флуорофор Су3. С помощью этих методов были проанализированы ключевые моменты начальных этапов эндоцитоза: связывание с рецепторами на мембране, формирование окаймленных ямок, их отщуривание от мембраны, образование и гомотипические слияния ранних эндосом. Оказалось, что эффективность интернализации зависит от концентрации используемых лигандов. Было показано, что клетки с разным уровнем гиперэкспрессии рецептора ЭФР различаются по характеру образования ранних эндосом. Следует подчеркнуть, что выявление рецептора или лиганда при отслеживании динамики эндоцитоза позволяет оценить различные стороны этого процесса.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-00838) и программы фундаментальных исследований президиума РАН № 24 по нанотехнологиям.

МУТАЦИЯ В ГЕНЕ БЕЛКА ПРЕСЕНИЛИН-1 ПРИВОДИТ К ГИПЕРАКТИВНОСТИ КАЛЬЦИЕВОГО СЕНСОРА STIM2. © К. В. Скобелева, М. А. Рязанцева. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ks.skobeleva@ya.ru

Болезнь Альцгеймера (БА) — тяжелое нейродегенеративное заболевание. Гистологическими маркерами этого заболевания являются нейрофибрилярные клубки и амилоидные бляшки в нервных тканях. Различают спорадическую и наследственную болезнь Альцгеймера (НБА). В 50 % случаев НБА обнаружены мутации в гене, кодирующем пресенилин-1 (PS1). Белок PS1 хорошо известен как компонент комплекса гамма-секретазы, участвующей в разрезании белка-предшественника амилоида. В связи с этим предыдущие исследования связывали патологию БА с нарушениями ферментативной активности PS1. Однако были обнаружены мутации в гене белка PS1, вызывающие БА, но не нарушающие ферментативной функции белка. Было показано, что мутация PS1 M146V приводит к изменениям в регуляции кальциевого гомеостаза в нейронах, включая нарушение депонирования кальция эндоплазматическим ретикуломом (ЭР).

Клетки нейробластомы человека SK-N-SH были трансфицированы конструкцией, несущей ген белка PS1 дикого типа и ген белка PS1 с мутацией M146V. Содержание Ca^{2+} во внутриклеточных депо определяли с помощью флуоресцентного зонда Fura-2AM. Для оценки количества содержащегося в клетке Ca^{2+} использовали иономицин, приводящий к опустошению внутриклеточных кальциевых депо. Для измерения депоуправляемого входа Ca^{2+} в клетку использовали тапсигаргин, действие которого вызывает опустошение кальциевых депо.

Обнаружено, что в модельных клетках НБА повышено содержание Ca^{2+} во внутриклеточных депо по сравнению с клетками, экспрессирующими PS1 дикого типа. Подавление экспрессии гена кальциевого сенсора STIM2 при помощи shRNA снижало содержание Ca^{2+} в ЭР модельных клеток НБА до контрольных значений. Полагают, что кальциевый сенсор STIM2 активирует преимущественно депоуправляемые кальциевые каналы, образованные субъединицей TRPC1. Подавление экспрессии гена TRPC1 также снижало содержание Ca^{2+} во внутриклеточных депо в модельных клетках НБА по сравнению с контролем. Также мы исследовали депоуправляемый кальциевый вход в клетку через 9 и 24 ч после трансфекции. Через 9 ч после трансфекции наблюдается увеличение кальциевого входа в модельных клетках НБА, а через 24 ч — его подавление. Возможно, что именно увеличение депоуправляемого кальциевого входа в модельных клетках НБА в первые часы после трансфекции вызывает повышение концентрации Ca^{2+} в ЭР. Известно, что STIM1 и STIM2 имеют разную чувствительность к Ca^{2+} . Поэтому кальциевый сенсор STIM1, имеющий сильное сродство к Ca^{2+} , активируется только при практически полном опустошении депо. Полного опустошения депо в модельных клетках НБА не происходит из-за его неполноты, поэтому STIM1 не активируется, что вызывает частичное подавление депоуправляемого входа Ca^{2+} в клетку. Таким образом, обнаружено, что в модельных

клетках НБА, экспрессирующих PS1 с мутацией M146V, источником патологического нарушения депонирования Ca^{2+} может быть активность кальциевого сенсора STIM2.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-31280), Carl Zeiss («ОПТЭК»), программы МКБ, стипендии президента РФ, ERA. Net-Rus, НШ — 1721.2014.4.

ВЛИЯНИЕ АГРЕГАТНЫХ И НЕАГРЕГАТНЫХ МУТАЦИЙ ГЕНА ДЕСМИНА НА ОСОБЕННОСТИ МИТОХОНДРИЙ В МЫШЕЧНЫХ КЛЕТКАХ. © Н. А. Смолкина, А. А. Костарева. Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, natalia.smolina@ki.se

Десмин является главным промежуточным филаментом мышечной ткани. Известно, что мутации в гене десмина ассоциированы с развитием кардиомиопатий и дистальных миопатий. Но патогенез заболевания до конца не изучен. Десмин принимает участие в пространственной локализации митохондрий в саркоплазме. В скелетной мускулатуре мышцей, нокаутных по десмину, было описано уменьшение числа митохондрий, причем их морфология была сильно изменена, также было нарушено внутриклеточное расположение. Ранее в нашей группе была создана мышечная модель, где животные несли десмин L345P. Анализ миофибрилл и кардиомиоцитов показал распухание митохондриального матрикса. Также были описаны изменения в захвате и высвобождении митохондриального кальция. L345P — агрегатная мутация гена десмина, но существуют также неагрегатные мутации. Целью данной работы было сравнение эффектов, оказываемых агрегатными и неагрегатными мутациями гена десмина на митохондрии. Изменения митохондриального кальция использовали в качестве оценки целостности митохондриальной мембраны и функциональных свойств митохондрий. Сателлитные клетки были получены из мышцы m. soleus от самцов линии C57BL/6 в возрасте 4—5 нед. Клетки были трансдуцированы лентивирусами, кодирующими ген десмина дикого типа или мутантную форму с агрегатными мутациями — A357P, L370P, с неагрегатной мутацией — D399Y. В качестве контроля эффективности трансдукции использовали лентивирус, кодирующий GFP. Клетки культивировали в пролиферативной среде, по достижении субконфлюэнтности среду заменяли на дифференцировочную. Дифференцировку проводили в течение 10 дней и полученные миотрубки брали в анализ. Клетки нагружали флуоресцентным красителем rhod-2 AM. Клетки стимулировали раствором 2 мМ хлор-м-крезола (CmC) или электричеством. Изменения в интенсивности флуоресцентного сигнала детектировали под конфокальным микроскопом. Полученные изображения анализировали с использованием программы ImageJ. Изменяли среднюю интенсивность сигнала в околядерной области клетки без стимуляции (F0) и в каждый момент времени в течение стимуляции (F). Соотношение F/F0 использовали для оценки кальциевых переходов в митохондриях. В своем анализе мы сравнивали амплитуды, полученные при разных стимуляциях, для разных состояний гена десмина. Миотрубки отвечали на химическую и электрическую стимуляцию осцилляциями митохондриального кальция. При воздействии CmC было

показано, что соотношение F/F0 для клеток, несущих десмин дикого типа, значительно выше, чем для клеток, несущих мутацию ($P < 0.05$). При сравнении ответов на электрическую стимуляцию оказалось, что соотношения F/F0 не различаются при применении стимуляции с частотами 10 и 100 Hz, при этом соотношение F/F0 при стимуляции 1 Hz значительно меньше ($P < 0.05$). Полученные для дикого типа соотношения F/F0 были выше, чем для агрегатных мутантных форм, однако для неагрегатной формы значительного отличия F/F0 зарегистрировано не было ($P < 0.05$). Захват кальция митохондриями различается в клетках, несущих десмин дикого типа и мутантный десмин. Важным критерием является тип мутации: агрегатные мутации способны значительно снижать количество захваченного кальция, в то время как неагрегатные мутации такого эффекта не имеют.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА iRFP — БЛИЖНЕИНФРАКРАСНОГО БИОМАРКЕРА НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ. © Олеся В. Степаненко, Г. С. Бубликов, Ольга В. Степаненко, К. К. Туроверов, И. М. Кузнецова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, lvs@incras.ru

Прижизненная визуализация процессов, происходящих в клетках, тканях и в целом организме с высоким разрешением в реальном масштабе времени, является одной из фундаментальных проблем молекулярной и клеточной биологии. Существенной вехой в развитии этого направления явились открытие GFP-подобных флуоресцентных белков и осознание того, что на их базе можно получать белки слияния с белками-мишенями, т. е. использовать их в качестве биомаркеров, позволяющих получать информацию о локализации целевых белков и протекании процессов, в которых они участвуют.

При создании новых мутантных форм с улучшенными характеристиками одна из задач состояла в создании флуоресцентных белков с наиболее длинноволновым спектром флуоресценции, что позволяло бы уйти от фонового свечения клетки. Однако даже флуоресцентные белки, имеющие наиболее длинноволновое положение спектров поглощения и флуоресценции, не попадали в спектральную область, отвечающую так называемому ближнеинфракрасному окну прозрачности биологических тканей, где уже не поглощают гемоглобин и меланин, но еще не поглощает вода. Решением этой проблемы может стать использование в качестве флуоресцентных маркеров комплексов бактериальных фитохромов с биливердином.

Объектом настоящего исследования стал ближнеинфракрасный флуоресцентный белок iRFP, полученный на основе бактериального фитохрома RpVphP2 из *Rhodospirillum rubrum*. Были проанализированы спектральные свойства ближнеинфракрасного белка iRFP в холо- и апоформе и изучены процессы денатурации-ренатурации этих форм белка под действием химического денатуранта гуанидингидрохлорида (GdnHCl). Охарактеризовано связывание iRFP в апоформе с биливердином.

Показано, что вторичная и третичная структура белка при связывании биливердина не претерпевает существенных изменений. При этом связывание биливердина приводит к значительному тушению триптофановой флуоресценции iRFP в результате безызлучательного переноса энергии от триптофановых остатков к хромофору белка.

Изучение процессов денатурации флуоресцентного белка iRFP в апо- и холоформе под действием GdnHCl показало, что наличие такой сложной структуры, как узел типа «восьмерка», не препятствует эффективному фолдингу белка, а необратимость денатурации iRFP в холоформе и агрегация молекул белка при ренатурации из полностью развернутого состояния связаны со встраиванием хромофора в белковую глобулу.

С использованием метода равновесного микродиализа показано, что биливердин взаимодействует с iRFP в апоформе в соотношении 1 : 1, т. е. достигается полное насыщение белка биливердином, и что конформация и микроокружение хромофора в образующемся комплексе такие же, как в нативном iRFP.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-01842), программы МКБ РАН и стипендии президента РФ (СП-65-2012.4).

ОСОБЕННОСТИ ФОЛДИНГА БЕЛКОВ С ТОПОЛОГИЕЙ БЕТА-БОЧОНКА НА ПРИМЕРЕ ОДОРАНТСВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА. © Ольга В. Степаненко, Олеся В. Степаненко, И. М. Кузнецова, К. К. Туроверов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, sov@incras.ru

Вопрос о том, как белки приобретают в процессе фолдинга нативное, функционально активное состояние, является ключевым в молекулярной биологии. Современная теория фолдинга белков, наглядно представленная в модели энергетической поверхности, объясняет формирование компактного, высокоорганизованного нативного состояния глобулярных белков, образование олигомеров, аморфных агрегатов или амилоидных фибрилл, а также определяющую роль взаимодействий между нативно-неупорядоченными белками и их партнерами. Несмотря на прогресс в понимании фолдинга белков, наши представления о сворачивании белков с топологией типа β -бочонка ограничены.

Белки большой группы одорантсвязывающих белков (ОВР), принадлежащей семейству липокалинов, имеют структуру типа β -бочонка. Бочонок классического ОВР образован из восьми β -ветвей (остатки 9—120), короткого α -спирального участка (остатки 124—141), за которым следуют 9-я β -ветвь бочонка (остатки 146—148) и неупорядоченный С-концевой участок белка (остатки 149—157). Внутренняя полость β -бочонка, сформированная преимущественно гидрофобными и ароматическими остатками, так же как отдельные петлевые участки, связывающие β -ветви бочонка, служат сайтом связывания лиганда. Белки этой группы привлекают значительный интерес исследователей как перспективный объект для конструирования оптических биосенсорных систем на опасные, в том числе взрывчатые и токсичные, вещества. Это связано с тем, что ОВР обладают высокой структурной пластичностью лигандсвязывающего центра, позволяющего настраивать его на взаимодействие с лигандом, структурно отличающимся от природного лиганда белка.

Димерный бычий ОВР (bОВР) характеризуется уникальной укладкой полипептидной цепи, отличающейся от укладки большинства одорантсвязывающих белков, имеющих мономерную структуру. В структуре bОВР α -спиральный участок каждой мономерной субъединицы

белка принадлежит β -бочонку другой субъединицы белка. Такой способ образования димеров и даже олигомеров, известный как «обмен доменами», был обнаружен во многих белках. Полагают, что «обмен доменами» влияет на стабильность белка в целом, увеличивая площадь взаимодействия между субъединицами белка. В некоторых случаях этот механизм формирования четвертичной структуры белка приводит к возникновению новых функций у белковых олигомеров, не наблюдаемых у мономерных белков. Результаты недавних исследований показали, что механизм олигомеризации посредством «обмена доменами» задействован на ранних этапах формирования амилоидных фибрилл.

В данной работе мы исследовали особенности процессов фолдинга белков с топологией β -бочонка и влияющие механизмы «обмена доменов» на стабильность и процессы сворачивания—разворачивания β -бочонка на примере рекомбинантного bОВР. Полученные данные были сопоставлены с результатами исследования стабильности и процессов фолдинга bОВР, выделенного из назальной ткани быка, и его мутантных форм, не склонных к димеризации посредством «обмена доменов».

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке программы МКБ РАН и стипендии президента РФ для молодых ученых (СП-563.2012.4).

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ. © А. В. Степанов, А. П. Руденко, Е. В. Байдюк. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, kalya_bay@mail.ru

Инфаркт миокарда (ИМ) и развивающаяся впоследствии хроническая сердечная недостаточность (ХСН) являются основными причинами смертности во многих странах мира. ХСН характеризуется неспособностью сердца обеспечивать адекватный сердечный выброс в соответствии с потребностями организма, что приводит к состоянию гипоксии в различных органах и тканях. Миокард является одним из активных потребителей кислорода, поэтому недостаток кислорода вызывает значительные нарушения его структуры и функции. Наиболее чувствительными к гипоксии структурами клетки являются митохондрии, однако морфология и функциональное состояние митохондрий кардиомиоцитов (КМЦ) при данном заболевании к настоящему моменту исследованы недостаточно.

В данной работе проведено электронно-микроскопическое исследование КМЦ левого желудочка (ЛЖ) сердца крыс через 6 мес после экспериментального ИМ, который вызывали методом перманентного лигирования левой коронарной артерии. Ультратонкие срезы ЛЖ для электронно-микроскопического исследования получали на ультратоме LKB III (Швеция) и просматривали в электронном микроскопе LIBRA 120 Carl Zeiss (Германия). Электронно-микроскопическое исследование миокарда крыс через 6 мес после операции позволило выявить значительный полиморфизм ультраструктуры КМЦ. Миофибриллы в цитоплазме КМЦ крыс с ХСН располагались менее упорядоченно, чем в цитоплазме КМЦ контрольных животных, встречались клетки с разобранными саркомерами и деструкцией других внутриклеточных структур, в том числе митохондрий. Эти изменения были

особенно выражены в перинфарктной зоне ЛЖ. Морфометрическое исследование митохондрий показало, что объемная плотность митохондрий не различалась во всех экспериментальных группах. В среднем митохондрии занимали около 30 % цитоплазмы КМЦ. Однако у крыс с ХСН в КМЦ происходило изменение соотношения площади митохондрий к площади, занимаемой миофибриллами. В перинфарктной зоне ЛЖ крыс оно увеличивалось на 20.6 % ($P < 0.05$) относительно контроля. В интактной зоне ЛЖ крыс с ХСН происходило увеличение средней площади митохондрий на 29.5 % ($P < 0.05$). Концентрация внутренних мембран митохондрий (КВММ) на единицу площади цитоплазмы в КМЦ перинфарктной зоны ЛЖ была на 26.3 % ниже ($P < 0.05$), чем в контроле. Общая протяженность ВММ в ЛЖ крыс с ХСН была на 37.5 % ниже ($P < 0.01$), чем в ЛЖ контрольных животных. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о значительном снижении уровня энергетического метаболизма КМЦ ЛЖ крыс с ХСН по сравнению с контрольными животными.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-31853 мол_а).

РЕГУЛЯЦИЯ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ, СВЯЗАННАЯ С ДИНАМИКОЙ ПРИМЕМБРАННОГО АКТИНА, В КЛЕТКАХ ПОЧКИ М-1 И ЛИМФОМЫ U937. © А. В. Сударикова,¹ Д. В. Илатовская,^{1,2} Е. А. Морачевская,¹ Ю. А. Негуляев.¹ ¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия, и ²Медицинский колледж Висконсина, США, anastasia.sudarikova@gmail.com

Вклад липидного бислоя и примембранного цитоскелета — один из центральных вопросов в изучении регуляции ионных каналов в электронеозбудимых клетках. Ранее показана функциональная связь активности потенциалнезависимых натриевых каналов с динамикой примембранного актина в клетках лейкемии K562. Основная задача настоящей работы — сравнительное исследование цитоскелетзависимой регуляции натриевых каналов в клетках лимфомы U937 и собирательных трубочек почки М-1. В опытах патч-кламп на клетках U937 обнаружена активация натриевых каналов (проводимость 10—11 пСм) при действии цитохалазина Д как в интактной клетке (cell-attached), так и в изолированном фрагменте (inside-out). Добавление к цитоплазматической стороне мембраны глобулярного (G) актина, полимеризующегося при повышении ионной силы раствора, приводило к быстрой (2—3 мин) инактивации каналов. При подаче предварительно сформированных филаментов существенных изменений активности не наблюдали. Имеющиеся результаты указывают на сходство основного механизма, контролирующего активность каналов в клетках U937 и K562: разборка кортикальных микрофиламентов способствует открыванию каналов, а полимеризация актина, напротив, приводит к их инактивации, т. е. переходу в закрытое состояние. Можно полагать, что потенциалнезависимые натриевые каналы в культивируемых клетках крови (U937 и K562) очень близки по функциональным свойствам и молекулярной природе. Результаты ОТ-ПЦР и ингибиторного анализа позволяют идентифицировать их как амилорид-нечувствительные натриевые каналы семейства ENaC.

Повышение активности каналов ENaC при действии деструкторов F-актина было показано ранее на различных объектах, включая нативный эпителий почечных канальцев. Однако конкретные механизмы регуляции каналов ENaC с участием микрофиламентов остаются неясными. Клетки М-1, в которых экспрессируются амилорид-чувствительные каналы ENaC, являются одной из распространенных экспериментальных моделей почечного эпителия. В отличие от клеток U937 мы наблюдали довольно высокую фоновую активность катионных каналов различной проводимости и селективности в клетках М-1. Среди них наблюдались каналы, подобные семейству TRPC, а также каналы с проводимостью 12—14 пСм, кинетические свойства которых позволяли отнести их к ENaC. В наших опытах показано повышение вероятности открытого состояния ENaC при действии цитохалазина Д (cell-attached и inside-out). В экспериментах inside-out с использованием G-актина исследовали влияние сборки филаментов на цитоплазматической стороне мембраны на активность каналов. В нескольких опытах наблюдали инактивацию каналов ENaC, вероятно обусловленную полимеризацией актина. Хотя кортикальные актиновые структуры в клетки крови и эпителии почек существенно различны, их связь с каналами ENaC, вероятно, реализуется сходным образом. Выявленный цитоскелетзависимый механизм регуляции может опосредовать влияние гормонов и факторов роста на активность натриевых каналов в различных типах клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-32143_мол-а) и гранта Carl Zeiss («ОПТЭК»).

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ НА ОСНОВЕ ЛИЗОЦИМА. © А. И. Сулацкая, И. М. Кузнецова, К. К. Туроверов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ansul@mail.ru

Амилоидозы — это большая группа заболеваний, характеризующихся образованием в различных органах и тканях организма внутри- и внеклеточных белковых депозитов в виде нерастворимых фибрилл. Накопление амилоидных фибрилл обнаружено при таких заболеваниях, как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, диабет второго типа, диализный амилоидоз и др. Процессы, лежащие в основе агрегации белков и ее патологического проявления при болезнях, в настоящее время изучены недостаточно. Выяснение молекулярных механизмов амилоидозов, установление белковой природы депозитов и их свойств, разработка методов прижизненной диагностики этих заболеваний и развитие терапевтических методов их лечения являются актуальными задачами. Успешность решения этих задач во многом зависит от фундаментальных знаний о структурных особенностях амилоидных фибрилл, образующих депозиты, их физико-химических свойствах, факторах, регулирующих их образование и разрушение, их влиянии на жизнедеятельность клеток и т. д.

Литературные данные свидетельствуют о том, что структура амилоидных фибрилл, полученных на основе различных белков и даже на основе одного и того же белка, несмотря на общее сходство в строении, может существенно различаться. Настоящая работа направлена на исследование полиморфизма амилоидных фибрилл на основе амилоидогенного белка лизоцима.

Амилоидные фибриллы были получены путем инкубирования лизоцима при различных условиях и исследованы с использованием ряда физико-химических методов. Данные электронной микроскопии, как и ожидалось, подтвердили общее сходство архитектуры исследуемых агрегатов — они представляют собой длинные тонкие неразветвленные образования. Основным подход, который был использован для сравнительного изучения структуры амилоидных фибрилл, основан на исследовании их взаимодействия со специфическим флуоресцентным зондом тиофлавином Т (ThT). С использованием абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии растворов, полученных методом равновесного микродиализа, были определены число мод связывания ThT с фибриллами, константы связывания и число мест связывания для каждой из мод, а также спектры поглощения, коэффициенты молярной экстинкции и квантовые выходы флуоресценции красителя, взаимодействующего с каждой из мод связывания. Полученные результаты свидетельствуют о различии параметров связывания ThT с амилоидными фибриллами на основе лизоцима, полученными при различных условиях, и характеристик связанного красителя, что подтверждает предположения о полиморфизме исследуемых фибрилл.

Таким образом, было показано, что предложенный нами подход чувствителен даже к небольшим различиям в структуре амилоидных фибрилл, которые сложно (если вообще возможно) обнаружить с использованием других современных методик. Результаты работы могут иметь существенное значение как для фундаментальных исследований, так и для медицины, поскольку фибриллы на основе одного и того же белка, образованные при различных условиях фибрилlogenеза, могут обладать различной токсичностью.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 13-04-02068-а и 12-04-01651-а) и Совета по грантам президента РФ (стипендия № СП-776.2012.4).

ИССЛЕДОВАНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ТРАНСПОРТА КАНАЛОВ TRPV5/V6 В КЛЕТКАХ JURKAT.
© В. Н. Томилин, С. Б. Семенова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, vntomilin@googlemail.com

Каналы семейства TRP играют важную роль в разнообразных процессах: от фоторецепции, осморегуляции, осязания и обоняния и ионного гомеостаза до кальциевого обмена в клетках. Основное внимание исследователей в области регуляции каналов семейства TRP до недавнего времени было сфокусировано на изучении биофизических характеристик этих каналов и сигнальных каскадов, контролируемых их активностью на плазматической мембране, тогда как регуляция пространственной динамики каналов TRP в клетке на данный момент изучена недостаточно. В настоящее время накапливается все больше данных, указывающих на значительную роль транспорта каналов TRP в регуляции их общей активности. Каналы TRPV5/V6 являются кальций-селективными каналами семейства TRP и играют важную роль в гомеостазе кальция в различных клетках и тканях организма. Ранее в работах различных лабораторий, в системах с искусственно экспрессированными каналами было показано, что каналы TRPV5/V6 подвержены активному Ca^{2+} -зависимому рециклированию и что транспорт везикул с этими каналами

в клетке осуществляется с помощью клатрин/динаминзависимого эндоцитоза.

Ранее мы показали экспрессию и функциональную активность каналов TRPV5/V6 в клетках Jurkat. Каналы TRPV5/V6 конститутивно активны, поэтому поверхностная экспрессия этих каналов, которая зависит от везикулярного транспорта, определяет общую активность этих каналов. В нашей работе мы исследовали влияние везикулярного транспорта в регуляции активности каналов TRPV5/V6 в клетках Jurkat. Электрофизиологические эксперименты (patch-clamp, конфигурации outside-out и whole-cell) показали постепенное ингибирование активности каналов после добавления в наружный раствор блокатора динаминзависимого эндоцитоза Dynasore (100 мкМ). Эксперименты с использованием кальций-чувствительного зонда Fura-2AM показали блокирование кальциевого входа в ответ на изменение концентрации внеклеточного кальция в клетках Jurkat после 5-минутной инкубации с Dynasore (100 мкМ). Эти данные могут свидетельствовать об участии экто/эндоцитоза в регуляции общей клеточной активности каналов TRPV5/V6, участвующих в контроле уровня кальция в клетках линии Jurkat.

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ СЕМЕЙСТВА ЯДЕРНЫХ РЕЦЕПТОРОВ NR4A ОНКОСУПРЕССОРОМ p53.
© О. А. Федорова, А. А. Дакс, П. Н. Курько, Н. А. Барлев. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и С.-Петербургский государственный технологический институт (Технический университет), fedorovaolgand@mail.com

Одним из важнейших супрессоров образования злокачественных опухолей является транскрипционный фактор p53, мутации которого обнаруживаются более чем в 50 % случаев раковых опухолей. Белок p53 экспрессируется во всех клетках организма и является короткоживущим белком, который быстро расщепляется протеасомами. Однако в ответ на различные стрессовые стимулы, прежде всего при нарушении целостности ДНК, происходит стабилизация p53. Активированный p53 является транскрипционным фактором, который выполняет роль онкосупрессора через регуляцию экспрессии генов-мишеней. Белок p53 способен взаимодействовать со специфической последовательностью ДНК и стимулировать экспрессию множества генов, включая p21, GADD45 и bax. Эти белки являются ключевыми регуляторами клеточного цикла, репарации ДНК и апоптоза, и таким образом p53 предотвращает деление поврежденных клеток. Обнаружение новых генов-мишеней транскрипционного фактора p53 имеет как фундаментальное, так и прикладное значение для молекулярной биологии. На основе данных по экспрессии p53-зависимых генов, полученных с помощью гибридизации РНК с микрочипами, в качестве одних из кандидатов на новые гены-мишени были выбраны гены семейства белков ядерных рецепторов NR4A1, NR4A2 и NR4A3. Белки этого семейства рецепторов представляют собой транскрипционные факторы и играют важную роль в клеточном ответе на повреждение ДНК, дифференцировке и апоптозе. В данной работе были использованы четыре клеточные линии — U2-OS p53⁺, U2-OSp53KD (нокдаун гена p53), HCT-116 p53⁺ и HCT-116 p53⁻ (нокаут гена p53). Для стабилизации белка p53 в U2-OS p53⁺ и HCT116 p53⁺ клетки обрабатывали противоопухолевым препаратом доксорубицином в тече-

ние 9, 12 и 24 ч. Накопление p53 контролировали количественно на уровне мРНК с помощью ОТ-ПЦР, а также качественно оценивали уровень экспрессии белков с помощью Вестерн-блоттинга. Уровень экспрессии NR4A1, NR4A2 и NR4A3 измеряли с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени. Результаты исследования показали, что уровень экспрессии генов семейства NR4A при активации транскрипционного фактора p53 достоверно отличается от уровня экспрессии в клеточных линиях, где p53 не активирован или отсутствует. Эти данные свидетельствуют о регуляции экспрессии семейства NR4A транскрипционным фактором p53 в ответ на повреждения ДНК, что позволяет говорить о новом механизме участия p53 в клеточном ответе на генотоксический стресс.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта правительства Российской Федерации № 11.G34.31.0069 от 21.10.2011, Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 14-04-32242 мол_а, 13-04-01024 А и 12-04-01397 А).

ИССЛЕДОВАНИЕ СОВМЕСТНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРОВ HDAC И ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ АГЕНТОВ НА ТРАНСФОРМИРОВАННЫЕ КЛЕТКИ. © Е. А. Филиппова, М. В. Иготти, С. Б. Светликова, В. А. Поспелов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, filippova-liza@list.ru

Ингибиторы гистоновых деацетилаз (HDACi) представляют собой новый класс потенциальных противоопухолевых агентов благодаря их способности избирательно подавлять пролиферацию трансформированных клеток, действуя в дозах, нетоксичных для нормальных клеток. Они 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, контролирующие 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 цитостатических агентов для более эффективного подавления развития опухолей или индукции в них апоптоза. Однако в настоящее время точные механизмы, с помощью которых HDACi оказывают подобный эффект на трансформированные клетки, остаются невыясненными.

Была исследована возможность сенсibilизации ингибитором HDAC бутиратом натрия (NaB) трансформированных клеток к действию различных цитотоксических агентов, используемых в терапии рака. Для этого были использованы агенты, нацеленные на различные фазы клеточного цикла, — ингибиторы полимеризации микротрубочек (колхицин и таксол), тормозящие пролиферацию на стадии митоза, а также ингибитор топоизомеразы II (этопозид), приводящий к ингибированию перехода S/G₂.

Оценка выживаемости клеток, проводимая с помощью МТТ-анализа, показала, что NaB способствует повышению чувствительности онкогенотрансформированных клеток E1A+Ras к действию всех исследованных цитотоксических агентов. Полученные данные дают

основания заключить, что концентрацию таксола и колцемида можно снизить в 4 раза при совместном использовании с NaB для достижения такого же снижения жизнеспособности клеток, как при использовании одного таксола или колцемида соответственно. В гистограммах FACS-анализа определяли увеличение субдиплоидного пика при совместном действии таксола и NaB, что указывает на возможную индукцию апоптоза. При этом NaB не вызывал усиления апоптотической гибели в клетках, обработанных колцемидом. Однако совместное действие NaB и колцемида приводило к сильному подавлению клоногенной выживаемости трансформированных клеток. Стоит отметить, что использованные концентрации веществ приводили к аддитивному эффекту, т. е. отсутствовало влияние одного вещества на характер действия другого. При этом синергичный эффект наблюдался при комбинированном действии этопозиды и NaB. Так, эффект снижения жизнеспособности трансформированных клеток при совместном действии NaB и этопозиды превышает сумму эффектов, наблюдаемых при изолированном действии веществ, т. е. наблюдается усиление токсического действия веществ.

СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА АНАЛОГА ТИОФЛАВИНА Т С РАСШИРЕННОЙ СИСТЕМОЙ π-СОПРЯЖЕННЫХ СВЯЗЕЙ. © Е. М. Филиппова,^{1,2} О. И. Поварова,² А. А. Маскевич,³ И. М. Кузнецова.^{1,2} ¹С.-Петербургский государственный политехнический университет, ²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и ³Гродненский государственный университет им. Янки Купалы, olp@incras.ru

В настоящее время флуоресцентные методы исследования используются во всех областях биологии. Флуоресцентные красители нашли свое применение не только в фундаментальных исследованиях — для визуализации различных биохимических процессов в клетках и тканях, для анализа структуры биомолекул и их комплексов в растворе, но и в медицине — для диагностики патологических нарушений, в социально значимых биосенсорных системах — для обнаружения и определения различных аналитов, например для обнаружения наркотических и взрывчатых веществ, для определения содержания вредных веществ в окружающей среде. При изучении процессов фолдинга и нарушений фолдинга белков нашли применение такие флуоресцентные зонды, как 1,8-анилино-нафталин сульфонат (АНС) и тиофлавин Т (ThT). Флуоресцентный краситель АНС используется для тестирования гидрофобных кластеров в структуре исследуемых объектов. Бензтиазольный краситель ThT используется для обнаружения, изучения структуры и кинетики образования амилоидных фибрилл — упорядоченных белковых агрегатов, возникновение которых сопутствует ряду тяжелых заболеваний человека, таких как болезни Альцгеймера и Паркинсона, прионные заболевания и т. д. Это обусловлено тем, что в водном растворе ThT имеет низкий квантовый выход флуоресценции, который при инкорпорации красителя в амилоидные фибриллы возрастает в тысячи раз. Большое практическое значение имеет создание аналогов ThT с «улучшенными» характеристиками, в частности с более длинными волновыми полосами поглощения и флуоресценции.

В работе были изучены спектральные свойства аналога ThT, в котором аминобензольное и бензтиазольное

кольца разделены полиеновой цепочкой с двумя двойными связями. Как и ожидалось, аналог ThT имеет значительно более длинноволновый спектр поглощения и флуоресценции по сравнению с ThT. Максимум поглощения аналога ThT наблюдается при длине волны 512 нм, ThT — 412 нм, максимум флуоресценции — 590 и 490 нм соответственно. Спектр поглощения красителя, встроенного в амилоидные фибриллы, определенный с использованием абсорбционной спектроскопии растворов, полученных методом равновесного микродиализа, является существенно более длинноволновым по сравнению со спектром свободного красителя в водном растворе. Квантовый выход флуоресценции аналога ThT при встраивании в амилоидные фибриллы значительно возрастает, спектр флуоресценции сдвигается в длинноволновую сторону. Максимум спектра флуоресценции наблюдается при длине волны 710 нм, соответствующей граничному значению так называемого спектрального окна прозрачности биологических тканей, в котором не поглощают естественные хромофоры биотканей (гемоглобин и меланин) и еще не поглощает вода. Настоящая работа является существенным шагом к созданию флуоресцентных красителей, которые могут быть использованы для проведения непосредственного тестирования амилоидных фибрилл в живых клетках и тканях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-90024-Бел).

ТРЕГАЛОЗА/МАЛЬТОЗАСВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ЭЛЕМЕНТА БИОСЕНСОРНОЙ СИСТЕМЫ НА ГЛЮКОЗУ. © А. В. Фонин, О. И. Поварова, Ольга В. Степаненко, И. М. Кузнецова, К. К. Туроверов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, alexfonin@incras.ru

В течение последних десятилетий наблюдается устойчивый рост числа больных диабетом. Для предотвращения неблагоприятных последствий повышения уровня сахара в крови необходим его непрерывный или достаточно регулярный контроль. В связи с этим актуальной является задача создания устройств, позволяющих непрерывно и неинвазивно измерять уровень глюкозы в крови человека. Перспективным направлением развития непрерывных методов мониторинга глюкозы является разработка биосенсорной системы, чувствительный элемент которой представлял бы собой белок, реакция которого с глюкозой носила бы обратимый характер. Для этих целей часто используются конканавалин А и D-глюкоза/D-галактозасвязывающий белок. Однако эти белки обладают относительно невысокой стабильностью. Мы предлагаем использовать в качестве чувствительного элемента биосенсорной системы на глюкозу высокостабильный трегалоза/мальтозасвязывающий белок (ТМВР) из периплазмы термофильных бактерий *Thermococcus litoralis*. Этот белок помимо своих природных субстратов способен связывать глюкозу с константой диссоциации комплекса белок—глюкоза 3—8 мМ. Собственная УФ-флуоресценция ТМВР изменяется незначительно при взаимодействии этого белка с глюкозой. Поэтому для регистрации взаимодействия ТМВР с глюкозой нами была исследована возможность использования флуоресцентных красителей, ковалентно присоединяемых к белку. Таким красите-

лем является BADAN (6-бромацетил-аминонафталин). Присоединение BADAN к ТМВР возможно только по цистеиновым аминокислотным остаткам. ТМВР содержит один собственный цистеиновый остаток, расположенный в активном центре белка. Нами не обнаружено изменения флуоресценции BADAN, присоединенного к дикому типу ТМВР при комплексообразовании этого белка с глюкозой. Это обусловлено тем, что цистеиновый остаток 182 расположен глубоко внутри лигандсвязывающего центра ТМВР и микроокружение этого остатка практически не изменяется при взаимодействии белка с глюкозой. Из анализа пространственной структуры ТМВР в комплексе с трегалозой, а также на основании знаний, полученных при работе с другими белками, следует, что наиболее перспективной областью для присоединения красителя являются периферийные участки активного центра ТМВР. В связи с этим были созданы мутантные формы ТМВР/C182S/A14C и ТМВР/C182S/A43C (замена C182S введена для исключения связывания BADAN с ТМВР по 182-му положению). Для того чтобы биосенсорная система непрерывно реагировала на изменения содержания сахара, константа диссоциации комплекса белок—глюкоза должна численно соответствовать искомому диапазону концентраций глюкозы. Константа диссоциации комплекса ТМВР/C182S/A14C-BADAN-Glc (3.4 мМ) соответствует концентрации глюкозы в крови здоровых людей (3—8 мМ). Мы рассматриваем мутантную форму ТМВР/C182S/A14C с присоединенным флуоресцентным красителем BADAN как основу для создания серии меченных красителями мутантных форм ТМВР с различным средством к глюкозе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Совета по грантам президента РФ (стипендии СП-2390.2012.4 и СП-563.2012.4).

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОК MDCK ПРИ СТИМУЛЯЦИИ ТРАНСПОРТА ВОДЫ И ИОНОВ ВАЗОПРЕССИНОМ И ФОРСКОЛИНОМ. © М. Р. Хамитова, А. Н. Горшков, Я. Ю. Комиссарчик. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, hamitovamar@rambler.ru

Поддержание водно-солевого баланса является жизненно важной функцией живых организмов. У млекопитающих эффективная осморегуляция достигается главным образом за счет функционирования системы концентрирования мочи в почках. Система концентрирования мочи организована по принципу противоточной мультипликации и представляет собой сложный молекулярный механизм, состоящий из большого набора белков-транспортёров и канальных белков для различных ионов, мочевины и воды. Эти транспортные белки строго специфичным способом локализованы в апикальных и базальных мембранах эпителиальных клеток различных отделов нефрона. Клетки MDCK1 являются культуральной моделью собирательных трубок почки. В настоящей работе была произведена оценка связи между структурной динамикой актина в клетках MDCK1 (методом флуоресцентной микроскопии) и динамикой транспорта ионов с помощью метода измерения трансэпителиального электрического сопротивления (TEER). Во всех исследованиях клетки были использованы в виде конфлюэнтного монослоя через 3—4 дня культивирования. Из ультраструк-

турного анализа можно сделать вывод о том, что конфлюэнтные монослои этих клеток представляют собой поляризованные эпителиальные слои со структурно различающимися базальной и апикальной поверхностями и выраженными зонами межклеточных контактов. В ходе работы были выполнены эксперименты по воздействию на клетки MDCK аргинин-вазопрессина (АВП) в концентрации 10—6 М и активатора аденилатциклазы форсколина в концентрации 10—5 М. Для оценки интенсивности ионного транспорта в эпителии измерили трансэпителиальное электрическое сопротивление. Было установлено, что в контрольных условиях TEER монослоя MDCK1, выращенных на пористых полиэфирных мембранных фильтрах, составляет 3000—4000 Ом·см². Воздействие как вазопрессина, так и активатора аденилатциклазы форсколина приводит к 2—3-кратному снижению TEER монослоя через 5 мин, что свидетельствует о стимуляции транспорта воды и ионов в клетках MDCK при воздействии этих веществ. Чтобы установить влияние АВП на организацию актинового цитоскелета, мы провели флуоресцентно-микроскопический анализ этих клеток, окрашенных родамин-фаллоидином. Было обнаружено, что воздействие АВП вызывает значительные изменения в организации актинового цитоскелета клеток MDCK. Происходит деполимеризация актина как в апикальной, так и в базальной областях клеток. В то же время актин в области межклеточных контактов не претерпевает существенных изменений. Среднее значение общей флуоресценции клеток MDCK, обработанных вазопрессинном, с апикальной стороны в 1.98 раза меньше среднего значения общей флуоресценции контрольных клеток. А среднее значение общей флуоресценции с базолатеральной стороны у клеток MDCK, обработанных вазопрессинном, в 1.82 раза меньше, чем у контрольных клеток. Полученные результаты свидетельствуют о важной роли актина в процессах трансэпителиального транспорта ионов и воды в вазопрессин-чувствительных эпителиях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-00101 А).

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В НАПРАВЛЕНИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ И ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК. © А. А. Худяков, А. С. Костина, А. Б. Малашичева. Институт цитологии РАН, Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, и С.-Петербургский государственный университет, hudiakov.aa@gmail.com

Технология индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) нашла применение в большом количестве исследований с момента их первого получения в 2006 г. Благодаря высокой пролиферативной и дифференцировочной способности иПСК стало возможным из ограниченного количества легкодоступного биопсийного материала (кожа или жировая ткань) получать культуры клеток от конкретных пациентов, схожие по своим характеристикам с первичными культурами. Получение эндотелиальных клеток от пациентов является трудоемким методом, а эндотелий и гладкомышечные клетки труднодоступны. Потребность же в изучении этих типов клеток

высока в связи с повреждением этих клеток при различных патологиях.

В ходе исследования из донорской жировой ткани была получена культура мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека, которые затем были репрограммированы в иПСК путем лентивирусной трансдукции полицистронным вектором, несущим кодирующие последовательности генов OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC. Далее полученные иПСК дифференцировали в направлении эндотелиальных и гладкомышечных клеток при помощи ингибитора GSK-3 киназы, запускающего дифференцировку в мезенхимном направлении, и стимуляции факторами BMP4, VEGF и PDGF (Tan et al., 2013).

В результате была получена смешанная популяция клеток, экспрессировавших маркеры гладкомышечных (гладкомышечный актин) или эндотелиальных (фактор фон Виллибрандта) клеток. Экспрессия маркеров выявлялась при помощи иммуноцитохимической окраски и метода ПЦР в реальном времени.

Разделить полученные культуры поможет описанный в литературе сортинг по маркерам CD34, KDR и PDGFRa, результатом которого являются субпопуляции CD34+ KDR+ и CD34- PDGFRa+, соответствующие эндотелиальным и гладкомышечным клеткам.

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ PPAR-GAMMA В РАЗВИТИИ АРИТМОГЕННОЙ КАРДИОМИОПАТИИ ПРАВОГО ЖЕЛУДОЧКА. © А. А. Худяков, А. Б. Малашичева. Институт цитологии РАН, Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, hudiakov.aa@gmail.com

Аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка (АКПЖ) развивается в постэмбриональном периоде и проявляется желудочковыми аритмиями и внезапной смертью. Патогенез заболевания характеризуется замещением мышечной ткани на соединительно-жировую преимущественно в правом желудочке. Молекулярные механизмы, лежащие в основе развития АКПЖ, остаются неизученными. Показано, что мутации в генах, кодирующих белки межклеточных контактов — десмосом, ассоциированы с заболеванием. Одним из них является плакоглобин, структурно и функционально напоминающий один из эффекторов сигнального пути Wnt бета-катенин. Было показано, что мутантный плакоглобин приводит к подавлению канонического сигнального пути Wnt/бета-катенин, что в свою очередь приводит к переключению дифференцировки клеток-предшественников с кардиогенного пути на адипогенный и рекапитулирует фенотип АКПЖ у мышей с такими мутациями плакоглобина. Кроме того, были показаны патологическая активация регулятора адипогенеза PPAR-gamma в образцах миокарда правого желудочка и совместная коактивация PPAR-alpha и PPAR-gamma в кардиомиоцитах, содержащих мутантный плакофилин. Предметом данного исследования является поиск связующего элемента между этими двумя сигнальными каскадами. В ходе исследования от пациента с АКПЖ, являющегося носителем мутации в гене *RKIP2* (плакофилина), и здоровых доноров были получены культуры мультипотентных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани (ММСК). Анализ уровня экспрессии PPAR-gamma показал, что экспрессия этого рецептора в клетках пациента повышена в 79.9 ± 15.5 раза по сравнению с клетками здоровых доноров. Однако при

индукции дифференцировки ММСК в адипогенном направлении уровень экспрессии PPAR- γ между группами не различался. В дальнейшем планируется оценить, связано ли повышение экспрессии PPAR- γ с количеством мутантного плакофиллина в клетке, при помощи введения кодирующей последовательности плакофиллина дикого типа и его мутантной формы.

ДИНАМИКА НАКОПЛЕНИЯ ПРО- И МАКРОГЛИКОГЕНА В ГЕПАТОЦИТАХ НОРМАЛЬНОЙ И ЦИРРОТИЧЕСКОЙ ПЕЧЕНИ КРЫС. © А. Ю. Честнова, Н. Н. Безбородкина, А. В. Малова, Б. Н. Кудрявцев. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, chestnova.anna@gmail.com

Известно, что цирроз печени (ЦП) вызывает серьезные нарушения углеводного метаболизма, и в частности метаболизма гликогена. Важным показателем состояния углеводного метаболизма в печени является не только содержание гликогена в клетках, но и структура его молекул. К сожалению, имеющиеся данные о содержании прогликогена (ПГ) и макрогликогена (МГ) в гепатоцитах цирротической печени практически отсутствуют. В связи с этим исследование структуры гликогена в гепатоцитах патологически измененной печени представляет актуальную задачу.

С помощью цитофлуориметрии было исследовано содержание ПГ и МГ в гепатоцитах нормальной и цирротической печени крыс после 48 ч голодания и через 10, 20, 30, 45, 60, 75, 90 и 120 мин после перорального введения животным 30%-ного раствора глюкозы. ЦП у крыс был получен путем ингаляционного воздействия паров CCl_4 . Животных, которые не подвергались воздействию CCl_4 , использовали в качестве контроля. Препараты-мазки изолированных гепатоцитов, полученные от опытных и контрольных крыс, окрашивали с помощью флуоресцентной PAS-реакции. Окраска препаратов в течение 40 мин $Au-SO_2$ выявляла МГ, а их последующая окраска в течение 50 мин $EtBr-SO_2$ — ПГ. Изображения клеток получали, используя микроскоп Axioscope, CCD-камеру DFC360 FX (1392×1400) и объектив Plan-NEOFLUAR 20×/0.50. Для возбуждения флуоресценции $Au-SO_2$ и $EtBr-SO_2$ были использованы интерференционные светофильтры 450—490 и 546 нм, для регистрации — интерференционные светофильтры 515—565 и 590 нм соответственно. Интенсивность флуоресценции клеток измеряли с помощью программы ImageJ. Для каждого препарата было измерено 100—150 клеток. Суммарное содержание гликогена (СГ) в каждой клетке было принято равным сумме МГ и ПГ.

Установлено, что в отличие от нормальной печени накопление СГ в гепатоцитах при ЦП происходило с задержкой и начиналось через 20 мин после введения глюкозы. Далее содержание СГ увеличивалось и в конце эксперимента было в 1.7 раза выше, чем у контрольных крыс ($P < 0.001$). Предполагается, что накопление гликогена может происходить либо за счет увеличения числа внешних ярусов его молекулы (увеличение содержания МГ), либо путем образования новых точек инициации его синтеза (увеличение содержания ПГ). Оказалось, что изменения СГ в клетках крыс обеих групп на разных этапах рефиндинга связаны главным образом с изменениями содержания МГ ($r = 0.906—0.999$, $P < 0.001$). Увеличение содержания ПГ в гепатоцитах контрольных крыс наблю-

далось в интервалах 0—30 и 45—75 мин. В отличие от нормы содержание ПГ при циррозе стало возрастать только после 60 мин, однако через 120 мин оно было выше контрольных значений в 1.5 раза ($P < 0.001$). Коэффициенты корреляции между СГ и ПГ в среднем составляли 0.863 ($P < 0.001$) в норме и 0.772 ($P < 0.001$) при циррозе. Таким образом, основной вклад в накопление СГ в гепатоцитах крыс в ходе гликогенеза вносит МГ как в норме, так и при ЦП. Вклад ПГ наиболее существен в нормальной печени в начале гликогенеза (10—30 мин), а в патологической — на более поздних его этапах (75—120 мин).

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-32378 мол_а).

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ КЛАСТЕРИЗАЦИЯ ИОННЫХ КАНАЛОВ В ПРОЦЕССАХ КЛЕТОЧНОЙ МЕХАНОТРАНСДУКЦИИ. © В. И. Чубинский-Надеждин. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, vchubinskiy@gmail.com

Способность клеток реагировать на изменение механических параметров окружения является одной из древнейших сенсорных систем в живой природе. Основные участники процессов клеточной механотрансдукции — механочувствительные ионные каналы — были обнаружены в плазматических мембранах клеток различных тканей и организмов от бактерий до млекопитающих. Для клеток эукариот наиболее типичными являются катионные кальцийпроводящие каналы, активирующиеся при растяжении клеточной мембраны (stretch-activated channels, SACs). Несмотря на широкое распространение, эукариотические SAC-каналы являются одними из наименее изученных с точки зрения молекулярной природы и степени участия в процессах внутриклеточного сигналинга. В то же время данный тип каналов представляет особый интерес с точки зрения молекулярной физиологии и медицины. В частности, SAC-каналы могут играть ключевую роль в процессах клеточной адгезии, миграции и кальциевой сигнализации. Вход кальция при механозависимой активации каналов может обеспечивать сопряжение между различными внутриклеточными процессами, в частности вносить вклад в метастатическую активность и повышенную инвазивную способность раковых клеток. Данная работа посвящена выявлению особенностей процессов клеточной механотрансдукции, связанных с функционированием SAC-каналов в плазматической мембране клеток млекопитающих. Для регистрации ионных токов через одиночные каналы использовали метод локальной фиксации потенциала (патч-кламп) в конфигурации cell-attached или inside-out. Механическую стимуляцию активности SAC-каналов осуществляли посредством уменьшения гидростатического давления в микропипетке. В качестве экспериментальных моделей были выбраны культивируемые клетки различного происхождения, включая нормальные и трансформированные эмбриональные фибробласты мыши (линии BALB/3T3 и 3T3B-SV40), клетки миелоидной и лимфоидной лейкемии человека (линии K562 и Jurkat). Была зарегистрирована активация SAC-каналов во всех клеточных линиях и показана катионная природа ионных токов. Выявлены значительные различия в кинетике функционирования

SAC-каналов в клетках крови по сравнению с эмбриональными фибробластами. Для SAC-каналов в клетках K562 и Jurkat характерна быстрая (менее 1 с) инактивация после снятия механического стимула, в то же время инактивация SAC-каналов в фибробластах происходила в течение 2—5 с. В экспериментах на клетках BALB/3T3 и 3T3B-SV40 (но не в клетках крови K562 и Jurkat) была обнаружена активация калиевых каналов, обусловленная стретчиндуцированным входом катионов, прежде всего кальция, в цитоплазму из внеклеточной среды. Показано, что активность калиевых каналов модулируется уровнем свободного ионизированного кальция в цитозоле. Регистрация токов через одиночные каналы, их кинетическое поведение и вольт-амперная характеристика позволяют полагать, что локальное поступление ионов кальция через SAC-каналы активирует «колокализованные» калиевые каналы. Обнаруженный феномен интересен с точки зрения выяснения путей сопряжения механозависимой активации каналов с процессами внутриклеточной и мембранной сигнализации.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта для молодых ученых компании ОПТЭК.

ХАРАКТЕРИСТИКА ИОННЫХ КАНАЛОВ В СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА.

© В. И. Чубинский-Надеждин,¹ В. Ю. Васильева,² А. П. Домнина,¹ Н. А. Пуговкина,¹ Ю. А. Негуляев,^{1, 2} Н. Н. Никольский.¹ ¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и ²С.-Петербургский государственный политехнический университет, vchubinskiy@gmail.com

Стволовые клетки эндометрия (СКЭ) человека представляют собой перспективный материал для применения их в различных областях клеточной терапии. Основными преимуществами СКЭ являются неинвазивный и доступный метод выделения клеток, их мультипотентность, высокая пролиферативная активность и стабильность кариотипа при длительном культивировании. Известно, что ионные каналы плазматической мембраны играют важную роль в различных процессах во всех живых клетках, включая миграцию, адгезию, кальциевую сигнализацию, поддержание мембранного потенциала и дифференцировку. Все эти процессы могут влиять на особенности культивирования и жизнедеятельности СКЭ, а также определять потенциальные направления использования СКЭ в регенеративной медицине. В данной работе впервые с помощью различных конфигураций метода локальной фиксации потенциала (патч-кламп, patch-clamp) на уровне одиночных каналов охарактеризован спектр ионных каналов в СКЭ. Показано, что в плазматической мембране СКЭ функционируют механочувствительные (МЧ) стретчактивируемые (stretch-activated, SAC) катионные ионные каналы, активирующиеся при растяжении клеточной мембраны. По своим характеристикам обнаруженные SAC-каналы типичны для клеток млекопитающих. Продемонстрировано, что в СКЭ присутствуют также калиевые механочувствительные ионные каналы высокой проводимости (ККВП), амплитуда тока 9 пА при поддерживаемом потенциале на мембране 30 мВ). В нескольких экспериментах наблюдалась одновременная стретч-зависимая активация SAC-каналов и калиевых каналов. Обнаружено также, что в клетках присутствуют калиевые каналы низкой проводимости (ККНП, около

0.9 пА при 30 мВ), не реагирующие на растяжение клеточной мембраны. Показано, что характерной особенностью функционирования калиевых каналов как высокой, так и низкой проводимости является их кальций-зависимость, т. е. способность к активации при повышении уровня внутриклеточного кальция. Исследование кальций-зависимости каналов проводили с помощью конфигурации inside-out, при которой возможен доступ к внутриклеточной стороне изолированного мембранного фрагмента. Концентрацию ионов кальция варьировали в диапазоне от 10^{-8} до 10^{-6} мМ (pCa = 8, 7 и 6). Продемонстрировано, что калиевые каналы низкой и высокой проводимости различаются по чувствительности к уровню внутриклеточного кальция. Показано, что ККНП активируются при повышении уровня кальция от 10^{-8} до 10^{-7} мМ, при дальнейшем повышении уровня кальция (до 10^{-6} мМ) наблюдаются изменение их кинетики и инактивация. В то же время при повышении уровня кальция до 10^{-6} мМ активируются ККВП. Таким образом, в СКЭ впервые описаны различные ионные каналы, вероятно играющие важную роль в процессах жизнедеятельности данной клеточной линии. Знание особенностей ионного транспорта и его регуляции в СКЭ может быть перспективно с точки зрения возможностей дополнительного «управления» данной клеточной линией, а также предсказания поведения клеток при культивировании и дифференцировке.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-00700).

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ФЛАВОНОИДОВ НА ФАЗОВОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ В ГИГАНТСКИХ МОНОЛАМЕЛЛЯРНЫХ ЛИПОСОМАХ. © Е. Г. Чулков, Л. В. Щагина, О. С. Остроумова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ev_chulkov@mail.ru

Физико-химические свойства липидного бислоя определяют многие процессы, протекающие в клетке, такие как слияние мембран, взаимодействие экзогенных соединений с плазмалеммой и др. Модельным объектом, позволяющим визуально характеризовать поведение липидов в мембране, могут служить гигантские моноламеллярные липосомы. Такие липосомы можно получить методом электроформации. Для этого 20 мкл исходного раствора липида в хлороформе в концентрации 10 мг/мл наносили на стекла, покрытые смесью оксидов индия и титана. После испарения растворителя липидную пленку гидратировали 0.5 М раствором сорбитола и подвергали воздействию переменного напряжения с частотой 10 Гц и амплитудой 3 В в течение 1 ч. Полученная суспензия содержала моноламеллярные липосомы диаметром 1—30 мкм. Латеральную гетерогенность визуализировали введением в исходный раствор липида флуоресцентного красителя N-(лиссамин родамин В сульфонил) дипальмитоилфосфатидилэтаноламина (Rh-DPPE). Наблюдение липосом осуществляли с помощью конфокального микроскопа 100×/1.4 HCX PL Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Мангейм, Германия). Известно, что в бислое Rh-DPPE включается преимущественно в жидкую неупорядоченную (*ld*) фазу, в результате чего она становится окрашенной и доступной для микроскопического наблюдения (Juhasz et al., 2010). Жидкая упорядоченная

(*lo*) и твердая (*so*) фазы остаются неокрашенными. Дискриминацию фаз *lo* и *so* можно провести на основе их морфологии: фаза *lo* представлена круглыми доменами — рафтами, а *so* — дендритическими доменами неправильной формы (Samsonov et al., 2001). Фазовое разделение в изучаемой системе характеризовали процентным соотношением гомогенно окрашенных липосом (*ld*), липосом с круглыми доменами (*ld+lo*) и липосом с дендритическими доменами (*ld+so*). Исследовано фазовое разделение в отсутствие и в присутствии биоханина А, флоретина и мирицетина в трех системах: липосомы из 80 мол. % диолеилфосфатидилхолина (ДОФХ) и 20 мол. % сфингомиелина мозга (СМ) (ДОФХ : СМ), 50 мол. % ДОФХ и 50 мол. % димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ) (ДОФХ : ДМФХ), 50 мол. % ДОФХ и 50 мол. % дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) (ДОФХ : ДПФХ). В отсутствие флавоноидов во всех системах не наблюдали фазы *lo*, и более 90 % липосом ДОФХ : СМ и около 70 % ДОФХ : ДМФХ или ДОФХ : ДПФХ содержали домены *so*. В 400 мкМ растворе биоханина А или флоретина количество липосом ДОФХ : СМ с доменами *so* уменьшалось приблизительно в 2 раза, в случае липосом ДОФХ : ДМФХ и ДОФХ : ДПФХ — в 4 и 7 раз соответственно и около 40 % липосом ДОФХ : СМ и 10 % ДОФХ : ДПФХ содержали круглые домены. Добавка мирицетина не приводила к изменению морфологии липосом. Наблюдаемое изменение латеральной гетерогенности липидного бислоя можно интерпретировать как разжижающее действие биоханина А и флоретина на фазу *so* мембраны. Мирицетин подобного действия не оказывал и в отличие от биоханина А и флоретина интенсивно тушил флуоресценцию Rh-DRPE. Эти факты свидетельствуют о различной локализации изученных флавоноидов в мембране.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-33121), НШ-1721.2014.4 и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

ПОЛИМОРФИЗМ ЛИПИДОВ, ИНДУЦИРОВАННЫЙ ФЛОРЕТИНОМ, БИОХАНИНОМ А И МИРИЦЕТИНОМ. © Е. Г. Чулков, О. В. Степаненко, Л. В. Щагина, О. С. Остроумова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ev_chulkov@mail.ru

В зависимости от соотношения липид/вода, pH, температуры и других факторов липиды способны образовывать в водных суспензиях бислойные и различные небислойные структуры. Разнообразные превращения между ними называются полиморфными фазовыми переходами. Они привлекают внимание исследователей в связи с участием в процессах локальной деструкции бислоя при трансмембранном транспорте, эндоцитозе и экзоцитозе, вирусных и бактериальных инвазиях, секреции белков и др. (Cullis et al., 1986; Тараховский, 2003). Нами исследовано влияние флавоноидов, флоретина, биоханина А и мирицетина на полиморфизм липидов в суспензии моноламеллярных липосом, сформированных из смеси 50 мол. % диолеилфосфатидилхолина (ДОФХ), 50 мол. % димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ) и 0.1 мол. % N-(лиссамин родамин В сульфонил) дипальмитоилфосфатидилэтаноламина. Липосомы диаметром 1—30 мкм

получали методом электроформации. Флавоноиды добавляли в суспензию до концентрации 400 мкМ из спиртовых растворов. Наличие в составе липосомальных мембран флуоресцентного красителя позволило с помощью конфокального микроскопа 100×/1.4 HCX PL Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Мангейм, Германия) наблюдать поведение систем до и после введения в них флавоноидов. В отсутствие флавоноидов в суспензии были видны только гигантские моноламеллярные везикулы. В присутствии флоретина помимо липосом в суспензии обнаруживали шарообразные структуры, состоящие из тонких вытянутых игольчатых образований, исходящих из центра. При наличии в суспензии биоханина А или мирицетина в образце обнаруживались волоконистые образования неправильной формы. Эти наблюдения позволили говорить об индуцированном флавоноидами переходе липидов из бислойной в небислойную фазу. Для подтверждения этого предположения с помощью дифференциальной сканирующей микрокалориметрии с использованием калориметра ДАСМ-4 (Биоприбор, Пущино, Россия) были получены термограммы образцов липосомальных суспензий. Образцы содержали 80 мол. % ДМФХ и 20 мол. % ДОФХ (концентрация липида 1 мМ) в дегазированной воде в отсутствие и в присутствии 400 и 2000 мкМ флоретина. В отсутствие флоретина на термограмме наблюдался один пик с максимумом около 16 °С, который может быть отнесен к термотропному фазовому переходу ДМФХ в бислое из твердой в жидкую неупорядоченную фазу. ДОФХ, имеющий температуру плавления около -18 °С, в исследованном диапазоне температур (от 7 до 90 °С) фазовых переходов не испытывает (Коупова, Caffrey, 1998). В присутствии флоретина обнаруживался дополнительный пик с максимумом в диапазоне 40—50 °С, который можно отнести к фазовому переходу небислойной фазы (Kim et al., 2013). Полученные результаты позволяют полагать, что флавоноиды способны инициировать образование в суспензии новой небислойной фазы.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-33121), НШ-1721.2014.4 и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

КАРИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ СУБЛЕТАЛЬНОГО ТЕРМОСТРЕССА. © М. А. Шилина, Л. Л. Алексеенко, Т. М. Гринчук. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, shili-mariya@yandex.ru

Эндометриальные мезенхимные стволовые клетки (эМСК) являются одним из наиболее перспективных источников материала для заместительной клеточной терапии. Использование культуры эМСК человека в медицинской практике предполагает наличие в них нормального неперестроенного кариотипа.

Цель данной работы — анализ структуры кариотипа эМСК человека после сублетального термостресса, вызванного кратковременным повышением температуры в процессе культивирования. Объекты исследования — клетки двух независимых линий, полученных сотрудниками группы ГМДиМК Института цитологии РАН из де-

сквимирированного эндометрия менструальной крови. На 6—10-м пассажах (линии 1 и 2 соответственно) эМСК в течение 30 мин были подвергнуты термострессу (45 °С вместо 37 °С в норме). После этого их культивировали 5—6 пассажей в стандартных условиях (37 °С) и кариотипировали после окраски хромосом дифференциально на G-диски. Идентифицировали хромосомы в соответствии с Атласом хромосом человека (Мамаева, 2002). Анализируемые эМСК характеризовались экспрессией поверхностных маркеров мультипотентности.

В условиях сублетального термостресса в обеих линиях наряду с клетками, имеющими нормальный кариотип, были выявлены метафазные пластинки с нарушением копийности хромосом и хромосомными поломками. Моносомию наблюдали по хромосомам 3 и 4 (линия 1) и 12 и 16 (линия 2), трисомию — по хромосомам 1 и 6 (линия 1) и 3 и 13 (линия 2). Поломки в хромосомах 1—4 (линия 1) и 7, 10—12 (линия 2) встретились неоднократно.

В контроле клетки с аналогичными кариотипическими дефектами также встречались, но по причине уникальности выявляемых изменений были отнесены к разряду случайных.

Сделан вывод о том, что повышение температуры в процессе культивирования эМСК является мощным фактором, дестабилизирующим структуры их кариотипа.

РОЛЬ ПРОДУКТА ГЕНА РЕТИНОБЛАСТОМЫ В ДЕТЕРМИНАЦИИ ЖИРОВОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ПОЛИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК. © П. С. Шило, Н. С. Петров, Б. В. Попов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ruuuuu@uap-dex.ru

Жировые клетки, избыточное образование которых вызывает ожирение, диабет и другие заболевания, дифференцируются из полипотентных мезенхимных стволовых клеток (МСК). В ходе жировой дифференцировки (ЖД) выделяют фазы детерминации (ДЖД) и терминальной дифференцировки (ТЖД). Природа сигналов, инициирующих образование жировых клеток, не очень хорошо изучена в отличие от фазы ТЖД, механизм которой в значительной степени понятен. Наиболее хорошо охарактеризованной моделью для изучения дифференцировки МСК является линия эмбриональных фибробластов мышцы СЗН10Т1/2 (10Т1/2), индуцибельных к дифференцировке в жировые, костные, хрящевые и мышечные клетки. Механизм ДЖД основан на взаимодействии нескольких сигнальных путей, среди которых важную роль играет сигнальный путь продукта гена ретинобластомы (pRb), являющийся универсальным регулятором клеточного цикла. Целью настоящей работы является исследование роли pRb в ДЖД. Предварительно мы получили линии клеток 10Т1/2, стабильно продуцирующие экзогенный pRb дикого типа ($\Delta V/X$), гиперактивную форму pRb, содержащую мутации 8 сайтов фосфорилирования ($\Delta p34$), или его функционально неактивную форму ($\Delta S/N$) с мутацией в Т-антигенсвязывающем домене. Показано, что сверхэкспрессия функционально активного pRb в линиях $\Delta V/X$ и $\Delta p34$ приводит к усилению по сравнению с материнскими клетками образования жировых включений, выявляемых при окраске клеток масляным красным через 7, 10 и 14 сут после индукции ЖД. Напротив, сверхэкспрессия неактивного pRb в линии

$\Delta S/N$ приводит к снижению образования жировых включений в данных условиях. При помощи полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) показано, что уровень экспрессии тканеспецифического регулятора ЖД Pparg- γ и маркеров жировой ткани Fabp4 и адипонектина при индукции ЖД в клетках $\Delta V/X$ и $\Delta p34$ выше, чем в $\Delta S/N$. Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что повышенная продукция функционально активного, но не мутантного pRb в полипотентных МСК способствует индуцированной ЖД.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-00252).

ОСОБЕННОСТИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ С АНЕВРИЗМОЙ ВОСХОДЯЩЕГО ОТДЕЛА ГРУДНОЙ АОРТЫ. © А. А. Шшишкова, А. Б. Малашичева. Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, и С.-Петербургский государственный университет, anastasiia.shishkova@gmail.com

Аневризма грудного отдела аорты развивается как результат серии событий, которые приводят к изменению структуры и состава внеклеточного матрикса стенки аорты, и в результате этих изменений происходит растяжение сосудистой стенки. Основными структурными и функциональными клеточными элементами, которые составляют стенку аорты, являются эндотелиальные и гладкомышечные клетки. Аневризма аорты, как правило, сопровождается дисфункцией эндотелия. Целью данной работы было изучение изменений, происходящих в эндотелиальной клеточной популяции у пациентов с аневризмой аорты. Клетки эндотелия аорты получали из фрагмента постоперационной ткани аорты пациентов энзиматическим методом. Контрольные эндотелиальные клетки получали из фрагментов ткани аорты здоровых доноров. Популяции эндотелиальных клеток доноров и пациентов сравнили по морфологии клеток, скорости пролиферации и уровню экспрессии эндотелиальных и гладкомышечных маркеров. Скорость пролиферации эндотелиальных клеток доноров была достоверно выше, чем скорость пролиферации клеток пациентов с аневризмой аорты. При иммуноцитохимической окраске в обеих популяциях выявляли маркер эндотелиальных клеток фактор Виллибрандта, что подтверждает эндотелиальную природу этих клеток. В популяции клеток от пациентов в некоторых клетках выявляли маркер гладкомышечных клеток — гладкомышечный актин, что свидетельствует о том, что в эндотелиальной популяции пациентов присутствуют клетки переходного фенотипа, что может сказываться на функции эндотелия пациентов. Популяции клеток также сравнили по уровню экспрессии генов *ACTA2* (гладкомышечный актин), *VWF* (фактор Виллибрандта), *PECAM1* (маркер эндотелиальных клеток) и показали, что уровень *ACTA2* достоверно выше в популяции эндотелиальных клеток пациентов, уровень *VWF* и *PECAM1* достоверно выше в популяции эндотелиальных клеток здоровых доноров. Полученные данные свидетельствуют об изменении функциональных свойств эндотелиальных клеток пациентов с аневризмой аорты по сравнению с клетками здоровых доноров.

ИЗУЧЕНИЕ БЕЛОК-БЕЛКОВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ MDM2 И SET7/9. © О. Ю. Шувалов, Г. С. Иванов, О. А. Федорова, Н. А. Барлев. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, oleg8988@mail.ru

Белок p53 является важнейшим онкосупрессором, контролирующим процессы пролиферации, апоптоза, старения и метаболизма. Участие p53 в столь разнообразных клеточных процессах во многом достигается за счет посттрансляционных модификаций, что в итоге приводит к существованию в клетке различных пулов p53, дифференциально взаимодействующих с различными белками. Одним из ключевых посттрансляционных модификаций p53 является динамическое метилирование аминокислотных остатков С-концевого регуляторного участка. Важную роль в стабилизации p53 играет метилтрансфераза Set7/9 (SETD7, Set9), монометилирующая p53 по K372.

Главным негативным регулятором p53 является E3-убиквитинлигаза MDM2, контролирующая уровень активности p53 за счет разнообразных механизмов — убиквитинирования с последующей протеасомной деградацией, ингибирования трансляции и физического блокирования транскрипторного домена. Кроме того, MDM2 взаимодействует с широким спектром белков, так или иначе влияющих на активность p53.

В данной работе мы впервые показали физическое взаимодействие MDM2 и Set7/9, а также выявили участки в обоих белках, ответственные за такое взаимодействие. Для этого нами была создана серия векторных конструкций, несущих последовательности полноразмерных изоформ, а также отдельные домены и делеционные варианты MDM2 (GST-MDM2 1-491, 1-332, 1-102, 61-491, 237-288, Δ53-222 и Δ28-300) и Set7/9 (6His-Set7/9 1-366, 1-240, 1-138; GST-Set7/9 1-366, 1-128, 128-214, 214-335 и

214-336), слитые с GST и гистидиновой меткой. Соответствующие рекомбинантные белки были экспрессированы в бактериальной системе и очищены с использованием Ni-NTA-агарозы и GST-сефарозы.

Далее мы проинкубировали очищенные варианты GST-MDM2 с ядерным экстрактом, полученным из раковых клеток линии U2OS (остеосаркома человека). В результате последующего Вестерн-блоттинга с использованием моноклональных антител, специфичных к Set7/9, мы показали взаимодействие данной метилтрансферазы с MDM2, а также выявили участок MDM2, ответственный за это взаимодействие.

С целью выявления участка Set7/9, взаимодействующего с MDM2, мы произвели инкубацию полученных вариантов 6His- и GST-Set7/9 с ядерным экстрактом, выделенным из клеточной линии U2OS, обработанных ингибитором протеасомной деградации MG132. Связавшиеся с 6His- и GST-вариантами Set7/9 белки были разделены в ПААГ с последующим Вестерн-блоттингом. MDM2 был детектирован с использованием моноклональных антител.

Таким образом мы показали взаимодействие E3-убиквитинлигазы MDM2 и метилтрансферазы Set7/9 *in vitro*, а также выявили участки обоих белков, вовлеченные в данное взаимодействие.

Дальнейшие исследования позволят установить роль этих взаимодействий в регуляции как p53, так и других важных транскрипционных факторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта правительства Российской Федерации № 11.G34.31.0069 от 21.10.2011 и Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 14-04-32242 мол_а и 13-04-01024 А).