

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

(Санкт-Петербург, 20—22 октября 2015 г.)

МЕХАНИЗМ НЕЙРОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ГОМОЦИСТЕИНА НА НЕЙРОНЫ КОРЫ МОЗГА И МОЗЖЕЧКА КРЫС IN VITRO. © П. А. Абушик, Ю. Д. Степаненко, Т. В. Карелина, Д. А. Сибаров, С. М. Антонов. Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, polinaabushik@gmail.com

Серосодержащая аминокислота гомоцистеин вовлечена в патогенез многих нейродегенеративных заболеваний. Однако механизм его нейротоксического действия остается малоизученным. Ранее было показано, что гомоцистеин, подобно глутамату, может связываться с ионотропными рецепторами глутамата NMDA-типа и метаболитными рецепторами глутамата I группы, а следовательно, может быть рассмотрен как эндогенный избирательный агонист данных типов рецепторов. Цель работы состояла в исследовании механизмов нейротоксического действия гомоцистеина на нейроны коры мозга и мозжечка крыс in vitro. Долговременное действие гомоцистеина (500 мкМ, 24 ч) вызывало гибель нейронов коры мозга и мозжечка крыс. Доля живых клеток после действия гомоцистеина составила 44.2 ± 3.1 % для нейронов коры мозга и 36.2 ± 7.1 % для нейронов мозжечка крыс. Для исследования начальных механизмов действия гомоцистеина были сопоставлены внутриклеточные кальциевые ответы, вызванные гомоцистеином, с ответами на NMDA и глутамат. В нейронах коры и мозжечка наблюдалась одинаковая тенденция — гомоцистеин вызывал кальциевые ответы осцилляторного характера, в то время как NMDA и глутамат вызывали «классическое» постепенное увеличение внутриклеточной концентрации кальция. Более того, в экспериментах по изменению митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\varphi_{mit}$) с помощью флуоресцентного зонда родамин-123 было показано, что в нейронах коры мозга крыс на начальных этапах действия (6 мин) гомоцистеин в отличие от NMDA и глутамата не вызывал падения $\Delta\varphi_{mit}$. Однако при его длительном действии (60 мин), как и в случае NMDA и глутамата, развивалось изменение $\Delta\varphi_{mit}$, сопоставимое с полным падением $\Delta\varphi_{mit}$ при разобщении дыхательной цепи протонофором FCCP. В связи с тем что циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) вовлечен в активацию нейропротекторных сигнальных путей, было интересно исследовать его влияние на нейротоксический эффект гомоцистеина. Форсколин (1 мкМ) как избирательный активатор синте-

за цАМФ полностью предотвращал гибель нейронов, вызванную гомоцистеином после 24 ч действия. Для определения вторичноактивируемых каскадов, вовлеченных в нейропротекторный сигнальный путь, были проведены эксперименты с ингибитором протеинкиназы А (РКА), блокатором протеинкиназы С (РКС) хелеритрином и ингибитором кальмодулинзависимой киназы II (CamKII) KN93. Ингибирование РКА при действии форсколина снижало его нейропротекторный эффект. Это можно рассматривать в качестве «контроля», так как известно, что цАМФ напрямую активирует РКА. Интересно, что блокирование РКС достоверно не снижало нейропротекторного эффекта форсколина при долговременном действии на нейроны коры мозга и нейроны мозжечка крыс, тем самым исключая вклад РКС в нейропротекцию. Наиболее эффективно нейропротекторный эффект форсколина снижал KN93, что определяет CamKII как участника вторичного каскада нейропротекторного сигнального пути. Полученные результаты демонстрируют, что в нейронах коры мозга и мозжечка крыс in vitro гомоцистеин вызывает осцилляторное увеличение внутриклеточной концентрации кальция, которое при долговременном действии может приводить к дисфункции митохондрий и вызывать гибель нейронов. Однако нейротоксический эффект гомоцистеина может быть предотвращен форсколином, что демонстрирует участие цАМФ в механизме нейропротекции.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 14-04-31707, 14-04-00227 и 15-04-08283).

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ МЕЛАМИНА И ФЕНОЗАНА НА ПУРИНОРЕЦЕПТОРЫ. © О. М. Алексеева,¹ Л. Д. Фаткуллина,¹ Т. В. Монахова,¹ Ю. А. Ким,² А. Н. Голощанов.¹ ¹ Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва, olgavek@yandex.ru, и ² Институт биофизики клетки РАН, Пущино.

В работе было протестировано влияние биологически активных веществ (БАВ) в широком диапазоне концентраций на функционирование пуринорецепторов и ионных каналов в клетках животного происхождения. Экранированный фенол — фенозан ($-\beta$ -(4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилфенил) пропионовая кислота), синтезирован в ИХФ

РАН, в ИБХФ РАН — его производные: феноксан — калиевая соль, антиоксидант и адаптоген, а также мульти-таргетные гибридные антиоксиданты — ИХФАНы — сложноэфирные производные метилокса (3,5-дитретбутил-4-гидроксибензилпропановой кислоты) и этаноламина (коламина), замещенного алкильными заместителями с разной длиной цепи 8—16 углеродных атомов. Регулятор роста растений — мелафен (меламиновое производное бисфосфиновой кислоты) — синтезирован в ИОФХ РАН. Мелафен, феноксан и ИХФАНы, примененные в виде водных растворов или эмульсий, в разных концентрационных диапазонах изменяют ионную (Ca^{2+} , K^+ и Cl^-) проводимость клеточных мембран, ингибируют пуринозависимую передачу информации в клетках (в АКЭ, тимоцитах и лимфоцитах). Функциональные изменения как общий клеточный ответ под влиянием феноксана и мелафена отслеживали методом первичного светорассеяния в разбавленных клеточных суспензиях регистрацией изменения клеточного объема при активации пуриновых рецепторов — метаботропных P2Y , каналобразующих P2X и P2Z — и при активации SOC (Ca^{2+} -каналы, управляемые опустошением внутриклеточных Ca^{2+} -депо). Феноксан и мелафен дозозависимо угнетают рецепторы Ca^{2+} -сигнализации и меняют SOC -проводимость в клетках АКЭ. Это отражается в первом и втором общих клеточных ответах. Мелафен также изменяет пуринозависимую Ca^{2+} -сигнализацию в тимоцитах и лимфоцитах.

Дозозависимое влияние ИХФАН-10 на структуру и функции мембран тестировали на эритроцитах и клетках АКЭ. Изучение структуры проводили при регистрации микровязкости методом ЭПР-спектроскопии с использованием двух спиновых зондов, локализующихся в поверхностном липидном бислое мембран на разной глубине (2—4 и 6—8 Å), что отражает состояние липид-липидных и белок-липидных взаимодействий в клеточной мембране. Показано что ИХФАН-10 в широком диапазоне концентраций, включая сверхмалые, модифицирует структурные свойства мембран эритроцитов и клеток АКЭ *in vitro*. Зависимость микровязкости мембран от концентрации ИХФАН-10 (в виде водной мицеллярной взвеси) имеет сложный нелинейный характер, в частности проявляются экстремумы. Обнаруженные структурные изменения мембран коррелировали с функциональной активностью Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов эритроцитов, регистрируемой потенциометрическим методом с использованием ионоселективных электродов. Методом спонтанного индуцированного гемолиза эритроцитов было установлено, что целостность клеток нарушается при применении БАВ в малых концентрациях. Как было показано с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии белковых микродоменов теней эритроцитов, цитоскелет эритроцитов значительно изменяется в присутствии больших концентраций феноксана и ИХФАН-10 и мало чувствителен к мелафену. Можно предположить, что влияние примененных БАВ на клеточную активность является не только отражением специфического воздействия на рецепторы и каналы на поверхности клеток, но также обусловлено и изменением структуры компонентов клетки.

АКТИНОВЫЙ ЦИТОСКЕЛЕТ В ПИТАЮЩИХ КЛЕТКАХ ЯИЧНИКОВ *CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA*, *PROTOPHORMIA TERRAENOVAE* И *SARCOPHAGA SP.* (DIPTERA). © Т. В. Ананьина, К. М. Климова. Научно-ис-

следовательский институт биологии и биофизики Томского государственного университета, tany_a@list.ru

В яйцевых камерах двукрылых насекомых ооцит и питающие клетки представляют собой единую систему с общей цитоплазмой. У дрозофилы в позднем оогенезе происходит быстрый выброс цитоплазмы питающих клеток (ПК) через кольцевые каналы в ооцит. Перед этим событием в ПК происходит значительная реорганизация актинового цитоскелета, направленная на фиксацию больших полиплоидных ядер в центральной области клетки. Во время стадии оогенеза 10В в цитоплазме ПК формируются актиновые пучки, направленные от плазматической мембраны к ядру, которые удерживают ядра клеток на месте и не позволяют им смещаться с током цитоплазмы и блокировать кольцевые каналы во время демпинга на стадии 11. Актиновый цитоскелет играет важную роль в интеграции процессов, происходящих на последних стадиях оогенеза, и его изучение у других видов двукрылых насекомых позволит узнать, насколько консервативна или пластична эта система в питающих клетках яичников. Овариолы мух *Calliphora erythrocephala*, *Protophormia terraenovae* (сем. Calliphoridae) и *Sarcophaga sp.* (сем. Sarcophagidae) окрашивали DAPI и фаллоидином, конъюгированным с FITC. Анализировали яйцевые камеры на стадии, соответствующей стадии оогенеза 10В дрозофилы. В ПК фаллоидином окрашиваются фибриллярный актин, формирующий кортикальный слой под плазматической мембраной, актин в кольцевых каналах и актиновые пучки в цитоплазме. У всех изученных видов организация актинового цитоскелета отличалась от таковой у дрозофилы. Наибольшее разнообразие актиновых структур обнаружилось у *Sarcophaga sp.*: в ПК кортикальный слой актина тонкий, от него отходят короткие тонкие актиновые фибриллы. У клеток, контактирующих с ооцитом, эти фибриллы (особенно со стороны ооцита) более длинные, их концы зафиксированы в слое актина, который располагается над ними. В цитоплазме клеток располагаются редкие скопления неупорядоченных, изогнутых пучков актиновых филаментов. Вокруг кольцевых каналов образуются актиновые фибриллы, которые направлены к ядрам контактирующих клеток, но не достигают их. Выраженность всех актиновых структур в ПК уменьшается в направлении от ооцита к переднему полюсу яйцевой камеры. У *C. erythrocephala* и *Pr. terraenovae* актиновый цитоскелет на этой стадии оогенеза менее выражен. Кортикальный слой сначала представлен многочисленными глыбками на внутренней поверхности плазматической мембраны, затем его поверхность выравнивается. Вокруг кольцевых каналов, соединяющих ПК, формируются ореол из актиновых фибрилл. Вокруг кольцевых каналов, соединяющих ооцит и ПК, по направлению к ядрам ПК начинают формироваться конусы из толстых актиновых фибрилл, которые удерживают ядра на расстоянии от кольцевых каналов. Конструкция из актиновых филаментов настолько прочна, что в области контакта с ядром ПК оно начинает деформироваться. Разнообразие стратегий ремоделирования актинового цитоскелета в ПК яичников у изученных видов двукрылых насекомых свидетельствует о пластичности этой системы.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы «Научный фонд им. Д. И. Менделеева Томского государственного университета» и частичной финансовой поддержке программы президента РФ (НШ 1279.2014.4).

ИЗУЧЕНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ С МИКРОТРУБОЧКОЙ N- И C-КОНЦЕВЫХ ДОМЕНОВ КИНЕТОХОРОНОГО БЕЛКА CENP-F МЕТОДОМ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ. © В. К. Аржанник,¹ В. А. Волков.² ¹ Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, arzhanik_work@mail.ru, и ² Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН.

Митоз — важный процесс, при котором происходит распределение генетического материала между дочерними клетками при делении. В этом процессе ключевым является взаимодействие между динамическими полимерами тубулина — микротрубочками (MT) и белковым супер-комплексом на хромосомах — кинетохором. CENP-F — фибриллярный белок с мол. массой 350 кДа локализован в кинетохоре в течение G₂-фазы митоза. Он важен для закрепления кинетохора на микротрубочке и необходим для правильной ориентации веретена деления (Laoukili J. et al., 2005). Структура CENP-F состоит из расположенных на N- и C-конце MT-связывающих доменов и участка суперспирали между ними (Feng J. et al., 2006). Данные по соосаждению и электронной микроскопии позволяют предположить, что N-концевые фрагменты CENP-F лучше связываются с изогнутыми прототфиламентами микротрубочек, чем с прямыми MT, стабилизированными таксомом, а C-концевые, наоборот, имеют большее сродство к прямым MT. Мы предположили, что CENP — возможный кандидат на роль сопрягающего устройства между кинетохором и микротрубочкой, которая способна развивать силы, достаточные для перемещения грузов (Grishchuk E. L. et al., 2005). Для исследования были созданы генетические конструкции отдельно для N- и C-концевых фрагментов CENP-F. Каждая конструкция включает в себя MT-связывающий домен и небольшой участок суперспирали CENP-F, а также расположенный на другом конце суперспирали вариант зеленого флуоресцентного белка с улучшенной способностью сворачиваться (superfolded GFP или sfGFP; Pédelaq J. D. et al. 2006). Взаимодействие CENP-F с микротрубочками, которые были помечены флуорофором NuLite или родамином, визуализировалось с помощью флуоресцентной микроскопии в режиме полного внутреннего отражения.

Было показано, что фрагменты CENP-F диффундируют вдоль MT и имеют различные коэффициенты одномерной диффузии. Оценены константы диссоциации одиночных молекул для обоих фрагментов CENP-F, их значения согласуются с литературными данными. Показана зависимость в связывании от концентрации соли, что говорит о существенном вкладе электростатических взаимодействий. Обработка MT субтилизином (протеазой, отщепляющей гибкий отрицательно заряженный C-конец тубулина, который важен для связывания многих белков; Skiniotis G. et al., 2004) полностью нарушает связывание C-концевого фрагмента с MT, в то время как у N-концевого связывание не нарушается полностью, но сильно снижается, что может говорить также о различии в механизмах связывания фрагментов CENP-F, а также о существовании на тубулине альтернативного сайта связывания N-конца CENP-F, не отщепляющегося субтилизином.

Полученные результаты выявляют механизм взаимодействия CENP-F с микротрубочкой.

Список литературы

- Laoukili J. et al., 2005. Nat. Cell Biol. 7 : 126—136.
Feng J. et al., 2006. Chromosoma. 115 : 320—329.
Grishchuk E. L. et al., 2005. Nature. 438 : 384—388.
Pédelaq J. D. et al., 2006. Nat. Biotechnol. 241 : 79—88.
Skiniotis G. et al., 2004. EMBO J. 23 : 989—999.

ПРЯМОЙ ЗАХВАТ ОСНОВНОГО БЕЛКА МИЕЛИНА 19S РЕГУЛЯТОРНОЙ СУБЧАСТИЦЫ ПРОТЕАСОМЫ В ОБХОД СИСТЕМЫ УБИКВИТИНИЛИРОВАНИЯ ОБУСЛОВЛИВАЕТ ПАТОЛОГИЧЕСКУЮ ЗНАЧИМОСТЬ МИЕЛИН-РЕАКТИВНЫХ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ. © А. А. Белогуров,^{1,2} А. Г. Габиров.^{1,2} ¹ Институт биоорганической химии им. М. М. Шенякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, belogurov@mx.ibch.ru, и ² Казанский (Приволжский) федеральный университет.

Рассеянный склероз (РС) — это системное аутоиммунное демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы человека, характеризующееся множественными повреждениями белого вещества. Среди главных аутоантигенов при РС выделяют несколько белков миелиновой оболочки, в том числе основной белок миелина (МВР), в значительных количествах присутствующий в мембране олигодендроцитов. В процессе метаболизма внутриклеточный протеолиз МВР может происходить под действием различных протеаз, а также мультикалитического протеиназного комплекса — протеасомы. Абсолютное большинство белков разрушается 26S протеасомой по убиквитинозависимому пути. Нами было установлено, что МВР принадлежит к крайне малочисленной группе белков, способных подвергаться протеолизу 26S протеасомой в отсутствие молекул убиквитина. Молекулярный механизм гидролиза МВР включает в себя опосредованное зарядом связывание с субъединицей Rpn10 регуляторной 19S субчастицы. Протеасома является главным протеолитическим комплексом, генерирующим пептиды, презентруемые на поверхности клетки в контексте комплексов гистосовместимости I класса. Отсутствие контроля за гидролизом МВР со стороны системы убиквитинилирования означает, что качественный и количественный спектры пептидов МВР, презентруемых на поверхности олигодендроцитов, практически полностью определяются каталитическими субъединицами протеасомы. Нами было установлено, что при развитии экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЕАЕ) — животной модели рассеянного склероза — в головном мозге иммунизированных животных конститутивная протеасома в значительной степени замещается иммунопротеасомой, при этом иммуносубъединица β1i локализуется преимущественно в олигодендроцитах. Показано, что повышенное содержание иммунопротеасомы в головном мозге мышей с ЕАЕ приводит к образованию повышенного количества ряда патогенных пептидов МВР, включая пептид ENPVVHFF, являющийся частью энцефалитогенного региона МВР. Активированные CD8+ Т-клетки, специфичные к данному пептиду, эффективно лизировали олигодендроциты, обработанные интерфероном-гамма. Специфический ингибитор иммуносубъединицы β1i селективно воздействовал на иммунопротеасому in vitro, а также эффективно подавлял развитие ЕАЕ in vivo у экспериментальных животных. Полученные факты указывают на возможную связь между уби-

квитинезависимой протеолитической активностью иммунопротеасомы в отношении основного белка миелина и развитием РС, а также на перспективность специфических ингибиторов иммунопротеасомы как потенциальных лекарственных средств.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-14-00585) «Молекулярный механизм убиквитинезависимого протеолиза белков протеасомой и его роль в норме и патологии».

ФОТОРЕЦЕПТОРНЫЙ КОМПЛЕКС ГРИБА *NEUROSPORA CRASSA* В ПЕРЕДАЧЕ СИГНАЛА ОКСИЛИПИНОВ У ГРИБОВ. © Т. А. Белозерская,¹ Г. П. Бачурина,¹ С. Ю. Филиппович,¹ Н. Н. Гесслер,¹ А. М. Макарова,² Н. В. Гроза.² ¹ Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Москва, tabinbi@mail.ru, и ² Московский государственный университет тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова.

У всех живых организмов окисигенированные производные жирных кислот — оксилипины — принимают участие в процессах развития и в ответах на внешние воздействия. Для исследования сигнальной трансдукции оксилипинов был выбран гриб-аскомицет *Neurospora crassa*, у которого характер размножения определяется совокупностью действия факторов питания и условий освещения. Конидии образуются в условиях углеводного голодания, а предшественники половых структур — протоперитеции — при азотном голодании. Оба процесса стимулируются светом сине-фиолетовой области спектра, передача сигнала которого контролируется фоторецепторным комплексом WCC. WCC образуется двумя PAS-доменосодержащими полипептидами WC-1 и WC-2, продуктами генов *white collar-1 (wc-1)* и *white collar-2 (wc-2)*. Непосредственную функцию восприятия фотона осуществляет полипептид WC-1, содержащий молекулу ФАД, нековалентно связанную с одним из PAS-доменов (LOV-домен). В работе исследовано регуляторное действие двух оксилипинов — 18-гидрокси-(9Z, 12Z)-октадекадиеновой кислоты (18-HODE) — производного линолевой кислоты и 18-гидрокси-(9Z, 12Z, 15Z)-октадекатриеновой кислоты (18-HOTrE) — производного линоленовой кислоты — на половое и бесполое размножение дикого типа *N. crassa* и мутантов *wc-1* и *wc-2*. Добавление к культуре 18-HODE приводило к увеличению количества протоперитециев в темноте. Синергизм действия азотного голодания и света был выявлен при концентрации 18-HODE 5 мкМ. Оксилипин 18-HOTrE не влиял на половое воспроизведение в темноте в концентрациях от 5 до 50 мкМ, однако вызывал незначительное (20 %) ингибирование этого процесса при освещении. Исследуемые соединения не оказывали влияния на образование протоперитециев у мутантов по фоторецепторному комплексу WCC. На диком типе *N. crassa* было показано, что 18-HODE (5, 10 и 20 мкМ) в темноте не влиял на конидиогенез, однако при освещении стимулировал образование конидий на 54 %. Обработка мицелия 18-HOTrE (5, 10 и 20 мкМ) в темноте также не влияла на количество образовавшихся конидий, а при освещении наблюдалось ингибирование конидиообразования на 30—50 % в зависимости от концентрации соединения. Оба соединения стимулировали конидиогенез у мутанта *wc-1* в темноте (18-HODE на 55, 18-HOTrE — на 35 %), но не влияли на

конидиогенез у мутанта *wc-2*. Таким образом, полученные результаты показывают, что стимуляция процессов размножения вызывается 18-HODE, производным преобладающей ненасыщенной жирной кислоты у *N. crassa*. Однако WCC-комплекс, несмотря на регуляцию всех фотозависимых ответов у *N. crassa*, по-видимому, участвует лишь в передаче сигнала данного соединения при образовании протоперитециев на мицелии *N. crassa*. В настоящее время трудно сказать, каким образом происходит передача сигнала оксилипинов при образовании конидий. Не исключено, что увеличение внутриклеточной концентрации АФК, вызванной добавлением оксилипинов к клеткам *N. crassa*, является стимулятором конидиогенеза. С другой стороны, существует, по-видимому, альтернативный путь передачи сигнала оксилипинов у *N. crassa*, включающий в себя сАМФ и протеинкиназу А.

РОЛЬ ОПОРНО-ДВИГАТЕЛЬНОГО АППАРАТА ОБОНЯТЕЛЬНЫХ ЖГУТИКОВ В ИХ ПОДВИЖНОСТИ. © Е. В. Бигдай, В. О. Самойлов. Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, cell@infran.ru

Методом прижизненной телевизионной микроскопии высокого разрешения исследовали молекулярные механизмы, обеспечивающие подвижность обонятельных жгутиков (ОЖ) лягушек *Rana temporaria*, кроликов, крыс и человека. Визуальный анализ видеоизображения показал, что ОЖ амфибий, млекопитающих, включая человека, обладают подвижностью вне действия пахучего стимула. ОЖ совершают неупорядоченные движения наподобие движения хлыста в руке погонщика. Иногда локомоция ОЖ имеет направленный характер. Они как будто приносятся к окружающей среде. Присущие ОЖ движения вне действия стимула обусловлены наличием в проксимальном участке цитоскелета набора из $(9 \times 2) + 2$ микротрубочки. В дистальной области его нет. Такой набор ультраструктур характерен для аксонем всех локомоторных ресничек и жгутиков. Микротрубочки в аксонеме называют «цитокостями». Они приходят в движение благодаря взаимодействию с головками динеиновых ручек — «цитомышцами», обладающими АТФазной активностью. Взаимодействие «цитомышц» с «цитокостями» активирует локомоцию ОЖ. Систему взаимодействующих «цитокостей» и «цитомышц» целесообразно называть не цитоскелетом, а опорно-двигательным аппаратом клетки. Такой термин в отношении цитоскелета различных типов клеток был предложен Ю. М. Васильевым в 1990-е годы. Активные движения совершает проксимальный отдел ОЖ, а дистальный пассивно следует за ним. По нашим данным, молекулы динеина не взаимодействуют с тубулином микротрубочек в отсутствие внеклеточного кальция. Для функционирования тубулин-динеиновой (Т-Д) системы Ca^{2+} поступает в цитозоль ОЖ через механочувствительные кальциевые каналы семейства TRP. Нами установлено, что дистальный отдел ОЖ, лишенный полноценного опорно-двигательного аппарата, в отсутствие одорантов проявляет кратковременное упорядочение своей активности благодаря полимеризации актина в нем, что подтверждается полученными нами данными фармакологического анализа и расчетом энтропии. Под действием одорантов двигательная активность ОЖ упорядочивается; дистальный отдел приобретает направленное движение в сторону одоранта. ОЖ присущ хемотаксис в градиенте концентрации действующего сти-

мула. Упорядочение движений обеспечивается полимеризацией актина в дистальном отделе ОЖ, которая инициируется одорантом, что было подтверждено методом конфокальной иммунофлуоресцентной микроскопии и в опытах с цитохалазином. Оказалось, что на фоне действия цитохалазина ОЖ не реагируют на одоранты. Таким образом, упорядочение локомоторной активности ОЖ осуществляет не Т-Д, а актин-миозиновая (А-М) молекулярная система подвижности. Следовательно, опорно-двигательный аппарат ОЖ включает в себя две молекулярные системы подвижности — Т-Д и А-М. Теперь выяснилось, что актиновые филаменты формируются и вне действия пахучих раздражителей. Мы предположили, что «пилотные» рыскающие движения ОЖ, которые совершаются вне действия одоранта, обуславливаются постоянной, но кратковременной полимеризацией и деполимеризацией актина в их дистальных отделах. Вероятно, неупорядоченный режим двигательной активности вне действия одорантов, с одной стороны, обеспечивает состояние предуготовленности и позволяет сравнительно легко переходить к определенному динамическому режиму, соответствующему реакции на предъявляемый стимул. С другой стороны, для упорядочения двигательной активности необходима полимеризация актина с образованием F-актина. Сложный процесс перестройки цитоскелета направлен на обеспечение направленного движения клеток в градиенте концентрации химических веществ (и по существу является хемотаксисом). Можно полагать, что обонятельные клетки, не имея возможности мигрировать в обонятельной выстилке, определяют градиент сигнальных молекул посредством упорядоченного движения своих ОЖ.

КОРРЕЛЯЦИЯ НАКОПЛЕНИЯ БЕЛКОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА СО СМЕНОЙ ИЗОФОРМ АКТИНА В КУЛЬТУРЕ КАРДИОМИОЦИТОВ. © Н. Б. Бильдюг, Е. С. Божоккина, С. Ю. Хайтлина. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, relapse@yandex.ru

В процессе длительного культивирования кардиомиоцитов происходит перестройка их сократительного аппарата с обратимым преобразованием типичных миофибрилл в неисчерпаемые актиновые структуры. Ранее нами было показано, что описанные перестройки сопровождаются синтезом кардиомиоцитами внеклеточного матрикса (ВКМ). Поскольку при культивировании кардиомиоцитов в трехмерных коллагеновых гелях не происходит реорганизации их сократительного аппарата, мы предположили, что белки ВКМ могут влиять на динамику сократительного аппарата кардиомиоцитов в культуре. Согласно литературным данным, при переводе кардиомиоцитов в культуру они начинают заново экспрессировать белки, в норме встречающиеся в ходе эмбрионального развития, в частности гладкомышечный актин. Задачей настоящей работы было исследовать, связаны ли перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов в культуре с появлением гладкомышечного актина, и оценить роль отдельных компонентов ВКМ в этом процессе. С помощью Вестерн-блоттинга мы показали постепенное накопление белков ВКМ коллагена и ламинина в ходе культивирования кардиомиоцитов. Максимальное количество этих белков наблюдалось на сроке, предшествующем восстановлению исходной организации сократительного аппарата кардиомиоцитов. При полном восстановлении мио-

фибриллярной организации наблюдалось снижение количества коллагена. С помощью ПЦР-анализа мы показали, что перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов сопровождаются сменой изоформ актина. На ранних сроках культивирования, когда сократительный аппарат клеток еще сохраняет миофибриллярную организацию, выявляется только сердечная изоформа актина. На сроке, соответствующем полной перестройке сократительного аппарата, в кардиомиоцитах экспрессируется гладкомышечная изоформа актина. При восстановлении миофибриллярной организации сократительного аппарата преобладает экспрессия сердечной изоформы актина, при этом экспрессия гладкомышечной изоформы сохраняется на низком уровне. Полученные данные подтвердились результатами Вестерн-блоттинга и иммунофлуоресцентного окрашивания клеток с использованием антител к гладкомышечной изоформе актина. Было показано, что появление гладкомышечного актина наблюдается в клетках в отсутствие ВКМ и предшествует перестройке их сократительного аппарата. Начальная стадия восстановления миофибриллярной организации, которой предшествует максимальное накопление коллагена и ламинина во внеклеточном матриксе, сопровождается снижением интенсивности окраски на гладкомышечный актин и уходом его из образующихся миофибриллярных структур. При полном восстановлении миофибриллярной организации сократительного аппарата, которое сопровождается снижением количества внеклеточного коллагена, гладкомышечный актин выявляется в незначительном количестве только в отростках клеток. Таким образом, мы показали, что перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов сопровождаются сменой изоформ актина, которая коррелирует с накоплением ВКМ. На основании полученных и литературных данных мы предполагаем, что ВКМ может регулировать процесс реорганизации сократительного аппарата кардиомиоцитов в ходе длительного культивирования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-00316) и Российского научного фонда (проект 14-50-00068).

МЕМБРАННЫЕ ВЕЗИКУЛЫ БАКТЕРИЙ *S. GRIMESII*. © Е. С. Божоккина,¹ А. П. Ивлев.² ¹ Институт цитологии РАН, bozhokina@yahoo.com, и ² НИУ СПбПУ, Санкт-Петербург.

Патогенные бактерии способны продуцировать ферменты, которые активно участвуют в патогенезе и используются для борьбы с конкурентными бактериями либо для проникновения в клетку-хозяина и выхода из нее. Известно, что значительную роль в адаптации к условиям среды и реализации вирулентности у грамотрицательных бактерий могут играть мембранные везикулы — сферические, окруженные мембраной наноструктуры (20—250 нм), продуцируемые клетками микроорганизма. В данной работе в культуре условно-патогенных бактерий *S. grimesii*, способных инвазировать клетки эукариот (Bozhokina et al., 2011), впервые обнаружены мембранные везикулы (МВ). Была проведена характеристика везикул с точки зрения их морфологии, ультраструктуры и роли в инвазии бактерий *S. grimesii* в эукариотические клетки. С помощью данных трансмиссионной

электронной микроскопии установлено, что *S. grimesii* продуцируют сферические мембранные везикулы, размер которых варьирует от 70 до 180 нм. Мембранные везикулы этих бактерий однородны по электронной плотности, что может свидетельствовать о гомогенности их состава. Количество мембранных везикул зависит от стадии роста бактериальной культуры. На логарифмической стадии роста *S. grimesii* (6—12 ч) МВ практически не секретируются. Максимальное количество МВ было обнаружено на поздней стационарной стадии роста бактериальной культуры (время роста 48—60 ч). Также количество МВ возрастало при добавлении в среду антиоксиданта N-ацетилцистеина. По размерам, морфологии и особенностям образования мембранных везикулы *S. grimesii* сходны с МВ патогенных бактерий. Известно, что МВ патогенных бактерий могут содержать различные факторы вирулентности, обуславливающие их патогенность. По результатам ПЦР-анализа установлено, что МВ *S. grimesii* не экспрессируют основных генов вирулентности патогенных бактерий. Установлено, что МВ *S. grimesii* способны ограниченно расщеплять актин. В дальнейшем планируется детально исследовать белковый состав МВ *S. grimesii*, что поможет в понимании механизма инвазии условно-патогенных бактерий.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-00316).

ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТА N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ФИБРОБЛАСТОВ ЗТЗ К БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНВАЗИИ. © Е. С. Божоккина,¹ А. П. Ивлев,² И. А. Гамалей,¹ Т. Н. Ефремова,¹ С. Ю. Хайтлина.¹ ¹ Институт цитологии РАН, bozhokina@yahoo.com, и ² НИУ СПбПУ, Санкт-Петербург.

Фибробласты широко представлены в тканях и отвечают за их гомеостаз. Несмотря на то что эти клетки в норме не способны к фагоцитозу, они чувствительны к инвазии бактериями (Aistui et al., 2010). Детальный механизм, по которому фибробласты могут быть инвазированы патогенными и непатогенными бактериями, на сегодняшний день неизвестен. Ранее мы показали, что обработка трансформированных клеток человека линий HeLa и CaCo2 антиоксидантом N-ацетилцистеином (НАС) увеличивает инвазию условно-патогенных бактерий *S. grimesii* и рекомбинантных *E. coli* K12, экспрессирующих ген гримелизина (Bozhokina et al., 2013). Изменение чувствительности клеток HeLa к инвазии коррелировало с увеличением экспрессии E-кадгерина, участвующего в адгезии клеток-хозяина и межклеточных контактах. Чтобы оценить влияние антиоксидантов на инвазию бактерий в нетрансформированные клетки, изучали инвазию условно-патогенных *S. grimesii* в клетки 3T3 Valb, предварительно обработанные НАС. По данным конфокальной микроскопии, обработка клеток 3T3 Valb 20 мМ НАС вызывала изменение морфологии клеток, разборку актиновых структур цитоскелета и появление ярко выраженных пучков стресс-фибрилл на периферии клеток. При инкубации клеток в 10 мМ НАС таких ярко выраженных изменений не наблюдали. По данным количественного микробиологического теста, 10 мМ НАС увеличивал адгезию бактерий *S. grimesii* к клеткам 3T3 Valb на 20 %, а инвазия бактерий в клетки не изменялась. После обработ-

ки клеток 20 мМ НАС адгезия и инвазия *S. grimesii* увеличивались примерно в 2 и 2.5 раза соответственно. По-видимому, увеличение адгезии бактерий в результате обработки клеток НАС способствует увеличению инвазии бактерий в ответ на антиоксидант. Эти результаты свидетельствуют о чувствительности нетрансформированных клеток 3T3 Valb к инвазии условно-патогенными бактериями и указывают на роль НАС в модификации поверхности клетки, способствующей проникновению бактерий. Поэтому на следующем этапе работы будет исследовано распределение поверхностных рецепторов клетки-хозяина, которые могут принимать участие в инвазии до и после обработки клеток НАС.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-00316).

ВЫСОКОДИСПЕРСНЫЙ КРЕМНЕЗЕМ С УЧАСТИЕМ МИКРОФИЛАМЕНТОВ ДЕТЕРМИНИРУЕТ ОБРАЗОВАНИЕ СВЯЗИ МЕЖДУ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫМИ ДЕПО КАЛЬЦИЯ В ООЦИТАХ СВИНЕЙ. © Е. Н. Бойцева, Т. И. Кузьмина, Л. Н. Ротарь, Д. А. Новичкова, В. Ю. Денисенко. Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных, Санкт-Петербург—Пушкин, prof.kouzmina@mail.ru

Понимание механизмов, детерминирующих формирование яйцеклетки in vivo, позволит совершенствовать методики экстракорпорального созревания ооцитов животных, методы клеточной и генетической инженерии. Ранее показано, что введение в среду дозревания ооцитов свиней высокодисперсного кремнезема (ВДК) способствует увеличению количества созревших клеток (Ковтун и др., 2012). Реинициация мейоза в ооцитах сопровождается мобилизацией кальция из внутриклеточных депо (ВД) (Santella et al., 1999). Теофиллин повышает концентрацию цАМФ внутри клеток (Dawson et al., 1991); в перемобилизованных клетках околочушных желез крыс цАМФ активирует рיאнодиноновые рецепторы, стимулируя освобождение Ca^{2+} из ВД (Rubin et al., 1994). ГДФ вызывает освобождение Ca^{2+} из IP_3 -нечувствительных ВД в ооцитах свиней (Денисенко, 2013). Цель настоящего исследования — проанализировать характер влияния ВДК, модифицированного галактозамином (ВДК-галактозамин) на мобилизацию Ca^{2+} из ВД ооцитов при воздействии теофиллина и ГДФ, а также оценить участие микротрубочек и микрофиламентов в данном процессе. Ооциты, выделенные из антральных фолликулов (3—6 мм в диаметре) постмортальных яичников свиней инкубировали в среде Дюльбекко без $CaCl_2$, содержащей 36 мг/л пирувата Na и 1 г/л глюкозы. Содержание кальция во ВД ооцитов измеряли с помощью флуоресцентного зонда хлортетрациклин (ХТЦ). Ооциты нагружали 40 мкМ ХТЦ 5 мин при 37 °С. Затем клетки отмывали в инкубационной среде, переносили на кварцевое стекло с ячейками объемом 0.05 мл. Интенсивность флуоресценции (ИФ) ХТЦ измеряли на флуориметрической установке, состоящей из люминесцентного микроскопа, снабженного необходимыми светофильтрами и фотометрической насадкой ФМЭЛ-1А. Комплекс ХТЦ- Ca^{2+} -мембрана возбуждали светом 380—400 нм, флуоресценцию регистрировали в области 530 нм. ИФ измеряли в усл. ед. Длительность воздействия ульт-

рафиолетового излучения на ооциты при проведении измерений не превышала 5 с. Все использованные в исследовании реагенты производства фирмы Sigma (США). В результате предварительной обработке ооцитов ВДК-галактозаминном наблюдали дополнительную мобилизацию Ca^{2+} из ВД при совместном действии теofilлина и ГДФ. В серии экспериментов, где все клетки предварительно обрабатывали ВДК-галактозаминном, с использованием ингибиторного анализа оценена роль микротрубочек и микрофиламентов в стимулированной теofilлином и ГДФ мобилизации Ca^{2+} из ВД. В ооцитах, обработанных ингибитором полимеризации микрофиламентов цитохалазином D (экспозиция 30 мин), наблюдали подавление дополнительной высвобождения Ca^{2+} при совместном действии теofilлина и ГДФ; в ооцитах, проинкубированных в тех же условиях в присутствии ингибитора полимеризации микротрубочек нокодазола, такого эффекта не выявлено.

Анализ данных литературы и полученные результаты показывают, что в ооцитах свиней комплекс ВДК-галактозамин детерминирует образование связи между ВД кальция, что приводит к дополнительной мобилизации Ca^{2+} из ВД при совместном действии теofilлина и ГДФ; в образовании такой связи между ВД вовлекаются микрофиламенты.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-90038 Бел_a).

ДИНАКТИН В РЕГУЛЯЦИИ ПОДВИЖНОСТИ СОPII-ОКАЙМЛЕННЫХ ВЕЗИКУЛ В КЛЕТКЕ. © И. Б. Бродский,¹ А. В. Бураков,¹ А. Д. Федорова,² Е. С. Надеждина.^{1,3} ¹ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, brodsky-i@yandex.ru, ² Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова и ³ Институт белка РАН, Пущино.

Синтезированные в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) белки должны попасть в аппарат Гольджи для дальнейшего прохождения по секреторному пути. Белки выходят из ЭПР в его домене, называемом ERES (endoplasmic reticulum exit sites), в мембранных везикулах, покрытых белковым комплексом СОPII. СОPII-окаймление везикул состоит из двух слоев: наружный образован гетеродимерами белков Sec13/Sec31, а внутренний — гетеродимерами белков Sec23/Sec24. Существуют противоречивые представления о том, подвергаются ли СОPII-везикулы активному транспорту в клетках и как этот транспорт может регулироваться. Полагают, что Sec23 может лабильно связывать динактиновый комплекс через его субъединицу p150^{Glued} (Watson et al., 2005), затем динактин может привлекать динеин, передвигающий везикулу по микротрубочке. Однако остается неясным, всегда ли наличие динактина означает также наличие динеина и всегда ли наличие динеина означает движение везикулы. В настоящей работе мы создали генетические конструкции, кодирующие слитые с GFP химерные белки Sec23-GFP-p150^{Glued}, позволяющие стабильно таргетировать динактин на СОPII-везикулы и ERES и исключить из рассмотрения тем самым возможный путь регуляции через связывание Sec23 с динактином. Используя различ-

ные делеционные варианты белка p150^{Glued}, мы оценили роль его доменов в регуляции транспорта по микротрубочкам. Прижизненные наблюдения за клетками Vero, трансфицированными Sec23-GFP-p150^{Glued}, показали, что подвижность СОPII-окаймленных структур в них существенно не отличается от контрольных клеток с экспрессией Sec23-GFP. При продукции в клетках мутантной формы Sec23-GFP-p150dh, лишенной N-концевого микротрубочкосвязывающего домена p150^{Glued}, подвижность ERES существенно падала, что согласуется с последними данными (Tripathy et al., 2014) о наличии у p150^{Glued} ингибирующего динеин домена CC1A, причем отключение ингибирования осуществляется при связывании N-конца p150^{Glued} с микротрубочкой. Для проверки этого предположения домен CC1A был также делетирован из молекулы p150^{Glued}, и при этом оказалось, что подвижность СОPII-везикул возросла. Как было показано в недавних исследованиях, механизм регуляции отделения и перемещения везикул включает в себя фосфорилирование Sec23, влияющее на взаимодействие с белками-партнерами. Так, для слияния везикулы с цистерной аппарата Гольджи в клетках дрожжей Sec23 должен быть фосфорилирован киназой Htt25p (дрожжевой аналог дельта-изоформы казеинкиназы 1, CK1delta), а для отпочкования везикулы от ЭПР, наоборот, дефосфорилирован. Обнаруженные сайты фосфорилирования консервативны у низших и высших эукариот, поэтому мы предположили, что фосфорилирование Sec23 киназой CK1delta может регулировать подвижность СОPII-окаймленных структур. Мы использовали мутанты, один из которых имитировал фосфорилированное состояние (Sec23EE-GFP), а другой был нефосфорилируемым (Sec23AA-GFP). Обнаружили, что при продукции мутанта Sec23AA-GFP подвижность ERES существенно падала, а при продукции Sec23EE-GFP она не менялась по сравнению с продукцией Sec23-GFP. Возможно, в клетках СОPII-везикулы постоянно связаны с динактином, и регуляция движения происходит на уровне привлечения динеина и регуляции его активности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 14-04-31496 мол-а, 14-04-01729-а и 15-04-02609-а).

УЧАСТИЕ БЕЛКОВ ЦИТОСКЕЛЕТА СЕПТИНОВ В РЕГУЛЯЦИИ КВАНТОВОЙ СЕКРЕЦИИ НЕЙРОМЕДИАТОРА. © Э. А. Бухараева,^{1,2} В. Ф. Хузахметова,^{1,2} Л. Ф. Нуруллин.^{1,2} ¹ Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, elbukhara@gmail.com, и ² Казанский (Приволжский) федеральный университет.

Септины — консервативное семейство ГТФ/ГДФ-связывающих белков, кодируемых у млекопитающих 14 генами и обозначаемых как Sept1—Sept14 (Mostowy, Cossart, 2012). Они являются филаментами, относящимися к белкам цитоскелета (Longtine et al., 1996). Открытые при исследовании деления клеток в культурах дрожжей (Gladfelter et al., 2001), как выяснилось позднее, септины связаны с большим разнообразием биологических функций, таких как процессы секреции, фагоцитоз, цитокинез, клеточная подвижность, и даже с нейробиологическими заболеваниями, такими как болезнь Паркинсона, множественная системная атрофия и шизофрения (Ihara et al.,

2003; Weirich et al., 2008; Suzuki et al., 2009). Снижение уровня экспрессии белка Sept7 обнаружено в синапсах мышцей с моделью болезни Альцгеймера (Liau et al., 2002). Одна из возможных функций этих белков состоит в том, что они могут участвовать в формировании пространственно-временных взаимоотношений между синаптической везикулой, содержащей нейромедиатор, и кальциевыми каналами, через которые входит Ca^{2+} , запуская процесс экзоцитоза. Результаты, полученные на центральных синапсах, показывают, что Sept2, Sept3 и Sept5, выявленные в области пресинаптической мембраны, имеют критическое значение для модуляции пространственного положения везикулы относительно зоны секреции и, таким образом, могут определять временные параметры секреторного процесса (Xue et al., 2004; Yang et al., 2010). Присутствие Sept4 как в синаптических везикулах, так и на пресинаптической плазматической мембране позволяет предполагать их функцию в транспортировке везикул и взаимодействии с мембраной в процессе экзоцитоза (Caltagarone et al., 1998). Показана коиммунопреципитация белков Sept5 и Sept2 с белком SNARE-комплекса синтаксином, который участвует в процессе нейросекреции (Dent et al., 2002). В ходе немногочисленных исследований взаимодействия септинов млекопитающих с другими белками показана их физическая ассоциация с компонентом «машины экзоцитоза» растворимым N-этилmaleимид-чувствительным фактором (NSF) SNARE-комплекса, который опосредует слияние синаптических везикул с пресинаптической мембраной в области активной зоны секреции. Проведенные нами исследования на синаптическом контакте диафрагмальной мышцы мыши показали, что блокирование септинов синтетическим цитокином форхлорфенуроном вызывает снижение уровня спонтанной квантовой секреции ацетилхолина и уменьшение количества квантов медиатора, освобождаемых в ответ на нервный стимул, а также изменяет временные параметры секреции квантов (Tokhtaeva et al., 2015). Иммуногистохимический анализ с использованием поликлональных первичных антител к Sept2, Sept7 и Sept9 и вторичных флуоресцентных антител выявил иммунопозитивную реакцию на Sept2, Sept7 и Sept9 в области нервно-мышечных синаптических контактов крысы. Полученные нами данные свидетельствуют о наличии в области периферических синапсов теплокровных белков септинов. Влияние блокатора их взаимодействия с комплексом синаптических белков на количество освобождаемых квантов нейромедиатора и временные параметры секреции указывает на участие белков септинов в регуляции нейросекреторного процесса.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-04-02983) и программы президента РФ (НШ-5584.2014.4).

ОСНОВНЫЕ БЕЛКИ, ПРИНИМАЮЩИЕ УЧАСТИЕ В ДЕПОУПРАВЛЯЕМОМ КАЛЬЦИЕВОМ ВХОДЕ В КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЯХ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА.
© В. А. Визонт, Ю. А. Колобкова, О. А. Зимица, Е. В. Казначеева. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, vvi-gand@gmail.com

Болезнь Хантингтона (БХ) — это аутосомно-доминантное нейродегенеративное заболевание, вызванное

умножением в первом экзоне гена белка хантингтина кодона CAG, кодирующего глутамин. В норме количество кодирующих глутамин повторов не превышает 35, в то время как при заболевании наблюдаются полиглутаминовые тракты длиной до 90 глутаминов и более. В первую очередь БХ поражает нейроны стриатума. Один из наиболее общих типов притока кальция из внеклеточной среды — депоуправляемый кальциевый вход. Для его активации необходимо понижение концентрации кальция во внутриклеточных депо. Основные белки, принимающие участие в депоуправляемом кальциевом ответе, — локализованные в мембранах эндоплазматического ретикула (ЭР) белки STIM (кальциевые сенсоры ЭР) и рецептор IP_3 (отвечает за выброс кальция из депо), а также белки плазматической мембраны, формирующие ионные поры каналов, а именно белки семейств TRPC и Orai. Ранее с помощью метода локальной фиксации потенциала (patch-clamp в конфигурации whole-cell) мы исследовали депоуправляемые токи кальция в моделях БХ на клетках мышечной нейробластомы (Neuro2a) и первичной культуре нейронов стриатума, изолированных из новорожденных мышат (MSN), и показали, что экспрессия N-концевого фрагмента мутантного хантингтина (Htt138Q) приводит к патологическому увеличению входа кальция через депоуправляемые каналы. Для того чтобы исследовать роль белков STIM1, TRPC1 и Orai1 в поддержании депоуправляемого входа в клетках-моделях БХ, мы подавили их экспрессию с помощью малых интерферирующих РНК и подтвердили эффективность супрессии с помощью иммуноблотов. Регистрация депоуправляемых токов показала, что в клетках Neuro2a Htt138Q и MSN Htt138Q депоуправляемый вход кальция в условиях супрессии белков STIM1 и TRPC1 снижался примерно на 60—70%. Это позволило сделать вывод о том, что депоуправляемый вход кальция в этих клетках опосредуется каналами, содержащими в качестве субъединицы белок TRPC1, и нуждается в присутствии сенсора кальция в люмене эндоплазматического ретикула, белке STIM1. Необходимо отметить, что в клетках Neuro2a Htt138Q супрессия белка TRPC1 не только приводила к выраженному снижению амплитуды депоуправляемых токов, но и способствовала входящему выпрямлению вольт-амперных характеристик регистрируемых токов. Подобное выпрямление характерно для каналов, образованных белками Orai1. Дальнейшие исследования показали, что супрессия белка Orai1 в клетках Neuro2a Htt138Q и MSN Htt138Q также приводит к выраженному (60—70%) уменьшению амплитуды депоуправляемых токов. При этом совместное подавление экспрессии белков TRPC1 и Orai1 в клетках Neuro2a Htt138Q не вызвало дальнейшего снижения депоуправляемого входа кальция. На основе полученных данных можно предположить, что для депоуправляемого входа кальция в клетках Neuro2a Htt138Q необходимо совместное действие белков TRPC1 и Orai1, поскольку последовательное снижение экспрессии данных белков не приводит к аддитивному подавлению амплитуды токов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-31137), Российского научного фонда, программы МКБ и стипендии президента РФ.

РАСТИТЕЛЬНЫЕ ГОРМОНЫ ПОВЫШАЮТ УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ИНВОЛЮКРИНА В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА. © М. С. Вильданова, М. А. Савицкая, Г. Е. Онищенко, Е. А. Смирнова. Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, vch41048@mail.ru

Растительные гормоны — это органические вещества, выделяемые клетками растений и действующие в низкой концентрации как регуляторы роста и дифференцировки. Жасмоновая кислота (ЖК) участвует в ответе растений на различные повреждения, а абсцизовая кислота (АБК) контролирует регуляцию перехода в состояние покоя при биотическом и абиотическом стрессах. Из данных литературы известно, что многие растительные гормоны способны оказывать влияние на жизнеспособность, пролиферацию, дифференцировку, синтетическую и секреторную активность клеток животных. Изучение действия растительных гормонов на клетки человека как в норме, так и при развитии патологических состояний может внести значительный вклад в создание новых подходов к разработке лекарственных препаратов растительного происхождения. В качестве объектов исследования использовали культивируемые кератиноциты человека HaCaT и клетки эпидермоидной карциномы человека A431. Ранее полученные нами данные показывают, что ЖК усиливает интенсивность общего белкового синтеза в обоих типах клеток, а АБК — только в клетках A431, однако до сих пор нет данных о том, с какими конкретно белками это может быть связано. Целью данной работы было исследовать с помощью методов иммуноцитохимии и Вестерн-блоттинга присутствие и локализацию белка инволюкрин (маркера дифференцировки кератиноцитов) в нормальных и опухолевых клетках эпителиального происхождения после обработки растительными гормонами. Инволюкрин синтезируется на свободных полисомах и при выявлении с помощью антител дает цитоплазматическое окрашивание разной интенсивности в клетках линии HaCaT, что предположительно может отражать степень дифференцировки клеток. Однако морфологических изменений после инкубации с растительными гормонами выявлено не было. В клетках A431 цитоплазматическое окрашивание имеют единичные клетки (предположительно являющиеся дифференцированными), тогда как в остальных выявляются перинуклеарные структуры, по морфологии напоминающие комплекс Гольджи. Было показано, что после инкубации с ЖК число клеток линии A431 с цитоплазматическим окрашиванием достоверно возрастает в 2.7 раза. Дифференцированные клетки могут чаще открепляться от монослоя и попадать в среду культивирования. В связи с этим мы исследовали действие растительных гормонов на две клеточные фракции — клетки, прикрепленные к субстрату, и клетки, открепившиеся от субстрата. С помощью иммуноблоттинга мы обнаружили, что после инкубации нормальных кератиноцитов человека с ЖК повышение экспрессии инволюкрин выявляется во фракции клеток, свободно плавающих в среде культивирования. В опухолевых клетках, прикрепленных к субстрату, уровень экспрессии инволюкрин повышается после инкубации как с ЖК, так и с АБК, а в открепленных от субстрата — только после инкубации с АБК. Таким образом, можно предположить, что ранее показанное нами усиление синтетической активности в клетках A431 при действии ЖК или АБК и в клетках Ha-

CaT после инкубации с ЖК связано с повышением уровня экспрессии инволюкрин.

РЕКОНСТРУКЦИЯ IN VITRO СВЯЗИ КИНЕТОХОРА С КОНЦОМ МИКРОТРУБОЧКИ И ИЗМЕРЕНИЕ РАЗВИВАЕМЫХ ПРИ ЭТОМ СИЛ. © В. А. Волков,¹ В. К. Аржанник,² А. Л. Дробышев,¹ Ф. И. Атауллаханов.¹ ¹ Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, vavolkov@gmail.com, и ² Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

Для безошибочного расхождения хромосом во время митоза они прикрепляются к веретену деления с помощью кинетохоров, белковых супер-комплексов, образующихся на центромерной области хромосом. Микротрубочки при росте запасают в своей стенке энергию ГТФ и при деполимеризации могут высвободить ее, оказывая на кинетохоры силу, которая теоретически была оценена в десятки пН (Grishchuk et al., 2012). Несмотря на то что сегодня известны почти все из около сотни компонентов кинетохора, механизм передачи силы от конца микротрубочки на кинетохор неясен. Мы решаем эту проблему, пытаемся воссоздать связь кинетохор—микротрубочка in vitro с использованием рекомбинантных компонентов кинетохора и микротрубочек, выращенных из очищенного тубулина. Экспериментальной моделью хромосомы служат стеклянные микросферы, несущие на поверхности кинетохорные комплексы. Мы измеряем силу, с которой микротрубочка тянет микросферу при деполимеризации, с помощью «лазерного пинцета»: микросферы захватываются в луч инфракрасного лазера, и затем регистрируется смещение микросферы из центра этого луча. С помощью этих подходов мы демонстрируем, что наиболее эффективная передача силы от микротрубочки на груз происходит при торцевом закреплении груза. Такая ориентация возможна лишь в случае, когда кинетохорные белки, взаимодействующие с микротрубочкой, прикреплены к поверхности микросферы с помощью гибких фибриллярных связей, позволяющих микросфере перейти из начального бокового закрепления в более эффективное торцевое. Мы также демонстрируем, что необходимым условием для эффективной передачи силы от микротрубочки на кинетохор является высокая аффинность микротрубочкосвязывающего элемента кинетохора к полимеризованному тубулину. Используя разработанные нами экспериментальные подходы, мы демонстрируем, что связь микротрубочки с кинетохором дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* может быть реконструирована с помощью кольцеобразного комплекса Dam1, «подвешенного» к микросфере на искусственных фибриллах длиной 100 нм (Volkov et al., 2013). Для реконструкции связи микротрубочек с кинетохорами человека мы использовали кинетохорный белок CENP-F, имеющий в своем составе эндогенную фибриллярную часть, образованную суперспиральными доменами. Таким образом, мы демонстрируем, что эффективное сопряжение движения хромосом с динамикой микротрубочек возможно благодаря торцевому закреплению кинетохора к концу микротрубочки.

Список литературы

Grishchuk E. L., McIntosh J. R., Molodtsov M. I., Ataullakhanov F. I. 2012. Force generation by dynamic microtubule polymers. *Comprehensive Biophysics*. 4 : 93—117.

Volkov V. A., Zaytsev A. V., Gudimchuk N., Grissom P. M., Gintsburg A. L., Ataullakhanov F. I., McIntosh J. R., Grishchuk E. L. 2013. Long tethers provide high-force coupling of the Dam1 ring to shortening microtubules. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 110 : 7708—7713.

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ КАЛЬЦИЙАКТИВИРУЕМЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ ПРИ ПОВЫШЕНИИ УРОВНЯ ГОМОЦИСТЕИНА. © А. Ш. Гайфуллина, А. Н. Мустафина. Казанский (Приволжский) федеральный университет.

Гомоцистеин (Гц) — серосодержащая, токсичная аминокислота, производное метаболизма метионина. Повышение концентрации Гц в плазме и цереброспинальной жидкости парадоксально угрожает развитию патологий нервной и сердечно-сосудистой систем. Хотя накопленные данные и доказывают связь Гц с нейродегенеративными заболеваниями, прямые эффекты Нсу на ионные каналы ЦНС не изучены. Кальцийактивируемые калиевые каналы (ВК-каналы) играют ключевую роль в регуляции возбудимости клеток. В связи с этим целью данной работы явилось исследование влияния Нсу на активность ВК-каналов в клетках GN3 гипофиза крысы.

Эксперименты проводили на культуре гипофизарных клеток крысы GN3, полученных из коллекции микроорганизмов и клеточных культур ФРГ.

GN3 — это нейросекреторные клетки передней доли гипофиза, характеризующиеся наличием натриевых, калиевых, кальциевых и хлорных каналов на поверхности мембраны и способностью генерировать спонтанные потенциалы действия. Клетки GN3 культивировали при 37 °C и влажности 90 % в растворе MEM (minimal essential medium), дополненном 7 % FCS (fetal calf serum) и 3 % HS (horse serum). Регистрацию электрических ответов проводили на 3—4-е сут после высаживания. Патч-пипетки изготавливали из боросиликатного стекла (Navard Apparatus) и имели сопротивление 5—8 МОм. Регистрацию в режимах whole-cell, outside out и inside out проводили с использованием усилителя Axopatch-200B с использованием программы Clamp10 (Axon Instruments/Molecular Devices, Sunnyvale, CA, США). При регистрации интегральных токов в режиме whole-cell нами не выявлено изменения амплитуды выходящих калиевых токов в ответ на подачу различных потенциалов мембраны от -80 до 120 мВ. Для выявления эффекта Гц на активность одиночных ВК-каналов Гц (50, 100 и 300 мкМ) апплицировали при потенциале фиксации 30 мВ в режиме регистрации outside out. Гц в концентрации 300 мкМ вызывал повышение вероятности открытия каналов до 0.0507 ± 0.008 (1 мин), 0.0448 ± 0.0093 (2 мин) и 0.0392 ± 0.0071 (3 мин) по сравнению с контролем 0.0424 ± 0.0062 ($P < 0.05$, $n = 17$), без изменения временных параметров и амплитуды токов одиночных каналов. Поскольку Гц не проникает через мембрану клетки, для выявления его эффектов с внутренней стороны мембраны мы проводили эксперименты в конфигурации inside out. Аппликация Гц (300 мкМ) не приводила к достоверному изменению вероятности открытия каналов, которая составила 0.0057 ± 0.0019 (1 мин), до 0.0056 ± 0.0022 (2 мин) и до 0.0066 ± 0.002 (3 мин) по сравнению с контрольными значениями 0.0091 ± 0.0043 ($P < 0.05$, $n = 7$). При этом значения амплитуды токов и временные характеристики не изменялись. Из литературных данных известно, что на гладкомышечных клетках эффект Гц проявлялся в усло-

виях изменения окислительно-восстановительного статуса клеток. Поэтому мы использовали окисляющий агент тимеросал. На фоне действия тимеросала активность ВК-каналов снизилась до 0.0075 ± 0.0037 (1 мин), 0.0074 ± 0.0041 (2 мин) и 0.0072 ± 0.0042 (3 мин) по сравнению с контрольными значениями 0.0093 ± 0.0042 ($P < 0.05$, $n = 5$), что связано с окислением субъединиц ионных каналов. Последующая аппликация Гц (300 мкМ) привела к значительному усилению вероятности открытия каналов до 0.0047 ± 0.0018 (1 мин), 0.0087 ± 0.0025 (2 мин), 0.0105 ± 0.004 (3 мин) по сравнению с контролем 0.0027 ± 0.0015 ($P < 0.05$, $n = 9$). По-видимому, Гц обладает восстановительными свойствами и напрямую увеличивает активность ВК-каналов в клетках GN3 в результате восстановления двойных дисульфидных S—S-связей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-15-00618).

ЦИТОСКЕЛЕТ И ТРАНСПОРТ ФОТОСИНТАТОВ У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ. © Ю. В. Гамалей. Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, ygamalei@mail.ru

Найденные у деревьев бессезонного и трав сезонного климата различия температуры циркулирующей в сосудах жидкости — свидетельство того, что термо- и криофилия растений развивались как зависимые от источника воды омбро- и гляциофилия. Вода из теплой и постоянно доступной в палеогене в неогене становится на 10—12 °C более холодной и доступной только сезонно. В результате бессезонные древесные формы теплого палеогена сменяются сезонными травами холодного неогена, а лесные сообщества — луговыми. Новые формы возникли в результате компенсаторной замены эффективного, но чувствительного к холоду эндоплазматического пищеварительного тракта на неэффективный, более энергозатратный, но свободный от температурной зависимости экзоплазматический (апопластный). Их сравнительное структурно-функциональное исследование — цель представленной работы.

Базовыми структурами внутриплазматического тракта являются эндоплазматический ретикулум и плазмодесмы. Техника локальных ледяных манжет использована для имитации блокады экспорта фотосинтатов холодом. Экспериментально установлено, что подавление актомиозиновой подвижности ретикулума ведет к повышению содержания крахмала в хлоропластах и сахарозы в апопласте. Коллапс ретикулума и элиминация плазмодесменных полей сопровождается развитием лабиринтов клеточной оболочки, интенсифицирующих транзит сахаров через апопласт. Их перенос через мембраны сопряжен с конвертацией до сахарозы. Следствием является унификация состава флоэмного экссудата.

Клетки с обеими альтернативными транспортными структурами относятся к числу наиболее насыщенных митохондриями. По этому признаку экспорт фотосинтатов — один из самых энергозатратных процессов у растений. В случае эндоплазматического канала транспорта высокий расход энергии связан с обеспечением актомиозинового механизма подвижности ретикулума (2—4 мкм/с, данные видеофильмов в реальном масштабе времени). При транзите через апопласт — с трансмембранным переносом сахарозы (моль АТФ на моль сахарозы).

Расчеты склоняют к выводу о большей энергоёмкости транспорта фотосинтатов по апопластному тракту. Актомиозиновая подвижность эндоплазматического тракта в благоприятном температурном диапазоне значительно дешевле. Вывод подтверждается соотношением потенциалов роста деревьев и трав. Гигантские поликарпические древесные формы имеют минимальный среди высших растений размер генома (1—2 пг). Эфемерные монокарпические травы, наоборот, отличаются рекордными величинами гаплоидного генома (десятки пг) и полиплоидией. Крупный геном, полиплоидия, унифицированный флоэмный экссудат — предпосылки для широкого распространения гибридизации среди трав, быстрого роста величины их таксонов. Общая для кайнозоя тенденция перехода от древесных долгожителей к эфемерным травам, от гигантов к карликам, от небольшого функционально эффективного генома к крупному неэффективному отражает генеральный тренд изменений климата от оптимального для высших растений к экстремальному. Кайнозойская эволюция форм высших растений — путь наращивания не продуктивности, а устойчивости. Климатический адаптогенез высших растений и животных по ряду параметров мог быть сходным. Среди них — изменения температуры межклеточной среды, ответственной за распределение трофических, регуляторных, гормональных соединений, за синхронизацию процессов белкового синтеза.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫХ АНТИГЕНОВ В НОРМАЛЬНЫХ И РАКОВЫХ КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ — НОВАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЭНИГМА. © О. Ф. Гордеева. Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, olgagordeeva@yandex.ru

Раково-тестикулярные антигены экспрессируются в сперматогенных и раковых клетках млекопитающих, а также на низком уровне в плюрипотентных стволовых клетках мыши и человека. Однако роль раково-тестикулярных антигенов в регуляции клеточных процессов в нормальных и опухолевых клетках, а также в процессе эмбрионального развития остается неизвестной, несмотря на более чем 20-летнюю историю их исследований. Специфические паттерны экспрессии раково-тестикулярных антигенов семейств *Mage* выявлены в сперматогенных, эмбриональных и внезародышевых клетках млекопитающих, тогда как в большинстве опухолевых клеток паттерны их экспрессии не являются специфическими для опухолей различного тканевого происхождения. В наших исследованиях впервые получены данные об экспрессии раково-тестикулярных антигенов в недифференцированных и дифференцирующихся плюрипотентных стволовых и тератокарциномных клетках мыши и человека, а также в эмбриональных соматических клетках мыши. Было впервые установлено, что в недифференцированных и дифференцирующихся плюрипотентных стволовых и тератокарциномных клетках мыши, а также в эмбриональных соматических и половых клетках мыши экспрессируются гены семейств *Mage-a*, *Mage-b*, *Mage-d*, *Mage-e* и *Mage-l2*, хотя и на более низком уровне по сравнению с семенниками взрослых мышей разных линий. Обнаружено, что экспрессия антигенов семейств *Mage*, вероятно, не связана со стадией клеточного цикла в изучаемых клетках, так как белки *Mage* выявлены во всех

клетках — как в клетках, находящихся в S-фазе, так и в других фазах клеточного цикла. Однако выявлены корреляции между экспрессией гена *C-myc* и генов *Mage* в плюрипотентных и тератокарциномных клетках — более высокая экспрессия гена *Mage-a4* коррелирует с более высокой экспрессией *C-myc*. Впервые обнаружены различия в экспрессии генов *Mage-a2* и *Mage-ab* в нуллипотентных тератокарциномных клетках мыши F9, неспособных к спонтанной дифференцировке, что может быть характерной особенностью для злокачественных тератокарциномных клеток. В то же время в дифференцирующихся под воздействием ретиноевой кислоты плюрипотентных стволовых и тератокарциномных клетках мыши паттерны экспрессии генов семейств *Mage-a* и *Mage-b* более сходны между собой, чем в недифференцированных клетках. Были также выявлены изменения в паттернах экспрессии генов семейств *Mage-a* и *Mage-b* в нормальных соматических эмбриональных фибробластах мыши при длительном культивировании *in vitro* и воздействии факторов, модулирующих пролиферативную активность. Полученные данные впервые демонстрируют участие генов семейств *Mage-a* и *Mage-b* в регуляции клеточных процессов как в нормальных плюрипотентных стволовых и эмбриональных соматических клетках, так и в опухолевых клетках.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-00419-а).

МНОГОФАКТОРНАЯ ПАТЧ-КЛАМП-СПЕКТРОСКОПИЯ КАК МЕТОД АНАЛИЗА ПРОЦЕССОВ СИГНАЛИЗАЦИИ И РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНЫХ ФУНКЦИЙ ИОННЫМИ КАНАЛАМИ. © О. В. Градов. Институт энергетических проблем химической физики им. В. Л. Тальрозе РАН, Москва, o.v.gradov@gmail.com

Известно, что различные каналы имеют разные частоты открытия и блокирования, разные константы времени. Так, быстрые калиевые каналы имеют порог активации -70 мВ, активируются за 1—2 мс и инактивируются за 10—15 мс, т. е. меняют состояние на порядок отличающимися скоростями; в то же время для калиевых каналов с медленной активацией константы могут достигать секунд. С другой стороны, электробиологические взаимодействия в «канало́ме» (channelome) приводят к смещению аддитивных «мод» скоростей или гистограммы электрофизиологических частот (так, кальциевый ток через так называемые CRAC-каналы может увеличивать частоту постсинаптических сигналов, а ионные каналы, обеспечивающие действие I_f -токов, контролируют частоты ритма нейронных структур, также как и K_{Ca} -каналы, которые участвуют в регуляции интервалов потенциала действия при настройке на определенные частоты). Иными словами, существует иерархия времен каналов (как и индуцируемых ими вторичных процессов) и соответствующих частот, на которых происходят физические отличимые друг от друга процессы, характер которых может быть сопоставлен с их частотно-временной характеристикой. Так как нарастание и спад активности в разных случаях происходят по-разному (с различным инкрементом / декрементом в случае индуцированных процессов), возможно сопоставление физиологически различных процессов с различной «формой ADSR» и частотно-фазовой

характеристикой. Как следствие этого возможно создание патч-кламп-спектроскопии каналов, в том числе в режиме реального времени, выбор переменных для которой зависит только от потребностей эксперимента и характера отклика канала. Нами создан программно-аппаратный комплекс для локальной фиксации потенциала (patch-clamp + voltage-clamp), способный работать в режиме TRT (True Real Time) и обрабатывать сохраненные патч-кламп-данные. Используя данную установку, можно осуществлять визуализацию спектров по разным неэквивалентным Y-переменным (амплитуда, магнитуда, фаза, действительная и мнимая компоненты, спектральная плотность мощности, статистика счета по импульсам, величины корреляции и статистической невязки и т. д.). Применяя в аналитической обработке патч-кламп-данных совместно эти подходы, можно получить информацию о множестве процессов, не отслеживаемых визуально по регистрограмме или простыми методами (например, обычным БПФ), что в конечном итоге должно стать основой автоматизированной идентификации данных клеточных / мембранных процессов и их комплексной регуляции в режиме реального времени. Метрологическая возможность построения ряда тонких зависимостей, основанных на объективных единицах измерений (что отличается от обычного вычисления в децибелах — относительных единицах), позволяет получить не только эвристически ценные качественные результаты при описании мембранно-биологических и интраканаломных процессов, но и «квантифицировать» их, т. е. получить количественные оценки, измерения функциональной активности (например, энергетические спектры по методу Прони с вычислением доверительных интервалов и статистических остатков и их процентной структуры, визуализацией диаграмм селекции комплексных корней и нелинейной численной аппроксимацией частотной характеристики). При этом возможность ввода результатов в базу данных и интерпретация их (в случае достоверной известности взаимно соответствующего им процесса или формы активности / отклика) как опорных сигналов при сличении с тем или иным результатом патч-кламп-регистрации позволяет производить своего рода «комплексный каналомный фингерпринтинг» по мультикритериальным базовым источникам, аналогично тому как это принято в спектрометрии.

ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ ФИЛАМЕНТЫ КЛЕТКИ РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ В ПРОЦЕССЕ ЕГО РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ В НЕЙРОНЫ ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ СЕТЧАТКИ У ТРИТОНА *PLEURODELES WALTL*. © Э. Н. Григорян. Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, e.grigoryan@hotmail.com

У тритона ретикулярный пигментный эпителий (РПЭ) обладает уникальной способностью к трансдифференцировке в клетки сетчатки *in vivo*. Это свойство позволяет регенерировать сетчатку после различного рода повреждений и даже в случае ее полного хирургического удаления. Цитоскелет клеток РПЭ отражает, с одной стороны, его эпителиальную и функциональную специализацию, с другой — способность к фенотипической пластичности. Мы исследовали состояние цитоскелета клеток РПЭ тритона *Pleurodeles waltl* в норме и в начале процесса репрограммирования в клетки сетчатки после ретинэктомии.

Для иммуноцитохимического выявления смены специфических белков цитоскелета использовали антитела против белка нейрофиламентов NF-200 и эпителиальных цитокератинов. В результате было обнаружено, что для нативного РПЭ тритона характерны панцитокератины, но не NF-200. Индукция к репрограммированию РПЭ путем изоляции сетчатки (удаление, отслойка) приводила к быстрому ингибированию экспрессии цитокератинов. То же наблюдалось и при изоляции и диссоциации клеток РПЭ этих животных. С высокой вероятностью это было вызвано меняющимися механическими условиями: потерей контактов клеток друг с другом, с выстилающей РПЭ мембраной Бруха и с нейральной сетчаткой, т. е. со всем клеточным окружением в РПЭ. Уже в первых клетках, выселяющихся из слоя РПЭ и меняющих фенотип, инициировалась экспрессия паннейрального белка NF-200 на фоне присутствия в клетках пигментных гранул и специфического белка промежуточных филаментов — виментина, характерного для мезенхимных клеток и экспрессирующегося при определенных патологиях сетчатки в РПЭ млекопитающих, показало отсутствие его в исходных клетках, но накопление в репрограммируемых клетках РПЭ тритона. Сходной была динамика экспрессии еще одного мезенхимного маркера — адгезивного белка N-cadherin, который в нативной ткани РПЭ выявлялся только на периферии, в ростовой области глаза, но в процессе трансдифференцировки клеток РПЭ получал все большее распространение по его слою. Со стадии формирования регенерата, состоящего уже из морфологически бластных клеток — предшественников нейронов новой сетчатки, существенно возросла экспрессия белка нейрофиламентов NF-200. Данные по цитоскелету РПЭ тритона в совокупности свидетельствуют о том, что входящие в его состав белки промежуточных филаментов могут быть активными участниками программы, меняющей судьбу клеток РПЭ от эпителиальной к нейральной. При этом в процессе репрограммирования имеет место этап, когда в клетках РПЭ присутствует смешанный (цитокератины, виментин, белки нейрофиламентов) набор белков промежуточных филаментов, что напоминает характер экспрессии белков промежуточных филаментов цитоскелета в опухолевых клетках. Позже в РПЭ тритона происходит переключение на считывание с генов, кодирующих белки нейральной дифференцировки, их накопление и, напротив, down-регуляция транскрипции генов промежуточных филаментов, специфичных для иных клеточных фенотипов. Лабильность этого процесса, включающего в себя фосфорилирование и дефосфорилирование исследованных белков промежуточных филаментов, предположительно является обстоятельством, облегчающим репрограммирование.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-00184).

СУПРЕССИЯ АКТИВНОСТИ КИНАЗЫ ATM СПОСОБСТВУЕТ ТЕТРАПЛОИДИЗАЦИИ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА, НЕ ПРЕПЯТСТВУЯ ИХ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОМУ СТАРЕНИЮ. © А. А. Грюкова, А. В. Бородкина, А. Н. Шатрова, П. А. Дерябин, Е. Б. Бузова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

В последнее десятилетие интенсивно исследуются реакции мезенхимных стволовых клеток человека (МСК) на различные стрессовые воздействия, включая УФ- и γ -излучение, тепловой шок и окислительный стресс, с целью разработки протоколов успешного применения этих клеток в регенеративной медицине. Было обнаружено, что в ответ на сублетальный стресс МСК могут входить в состояние преждевременного старения, сопровождающееся необратимой потерей пролиферации и характерными фенотипическими изменениями. Преждевременное старение стволовых клеток может приводить к утрате их способности регенерировать поврежденные ткани, что следует учитывать при трансплантации стволовых клеток для лечения различных заболеваний. Таким образом, исследование молекулярных механизмов, регулирующих процесс развития преждевременного старения стволовых клеток, имеет несомненную практическую значимость. Ранее мы показали, что эндометриальные стволовые клетки человека (эМСК) подвергаются преждевременному старению в ответ на сублетальный окислительный стресс (200 мкМ H_2O_2 в течение 1 ч). При исследовании механизма преждевременного старения эМСК мы обнаружили быструю (в течение 30 мин) активацию киназы ATM, которая сохранялась в течение нескольких дней, что свидетельствовало о возможной вовлеченности ATM в процесс как индукции, так и развития H_2O_2 -индуцированного старения эМСК. Для исследования роли ATM использовали специфический ингибитор киназной активности Ku55933 (Ku). Предобработка клеток с помощью 10 мкМ Ku не влияла на жизнеспособность эМСК, однако эффективно блокировала фосфорилирование ATM по *Ser1981*. Как и ожидалось, ингибирование ATM приводило к снижению уровня фосфорилирования p53 по *Ser15*, экспрессии белка p21 и небольшому, но заметному увеличению фосфорилирования Rb в H_2O_2 -обработанных эМСК. Несмотря на подавление функциональной активности p53/p21/Rb-пути, опосредующего блок цикла в стареющих клетках, эМСК не способны были возобновить пролиферацию. Более того, ингибирование ATM не влияло на увеличение размера и активности SA- β -Gal в H_2O_2 -обработанных клетках; таким образом, сохранялся фенотип, характерный для стареющих клеток. Очевидно, ингибирование ATM не способно было предотвратить развитие преждевременного старения эМСК. Анализ прогрессии клеточного цикла выявил постепенное накопление H_2O_2 -стимулированных эМСК в G_2/M -фазе, вызванное Ku, тогда как в отсутствие ингибитора H_2O_2 -обработанные клетки демонстрировали ожидаемый G_1/S -блок цикла. Важно отметить, что ингибирование ATM приводило к тетраплоидизации H_2O_2 -обработанных эМСК, о чем свидетельствует появление популяции клеток с увеличенным содержанием ДНК (8n), доля которых со временем существенно возрастала (15 % через 7 сут после окислительного воздействия). На основании полученных результатов можно заключить, что ингибирование ATM, с одной стороны, отменяет H_2O_2 -индуцированный блок клеточного цикла благодаря снижению функциональной активности ATM/p53/p21/Rb-пути и позволяет поврежденным клеткам достигать G_2/M -фазы, а с другой — препятствует вхождению клеток в митоз и приводит к появлению тетраплоидных клеток.

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОМЕХАНИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК МИТОТИЧЕСКОГО КИНЕЗИНА CENP-E С

ПОМОЩЬЮ ОПТИЧЕСКОГО ПИНЦЕТА. © Н. Б. Гудимчук,¹⁻³ Е. В. Тарасовец,⁴ В. В. Мустяца,³ А. Л. Дробышев,² Б. Витре,⁵ Д. Кливленд,⁵ Е. Л. Грицук,⁴ Ф. И. Атауллаханов.¹⁻³ ¹ Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, gudimchuk@yahoo.com, ² Физический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, ³ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва, ⁴ Пенсильванский университет, Филадельфия, США, и ⁵ Университет Калифорнии, Сан-Диего, США.

Кинезины — моторные белки, большинство из которых способны использовать энергию гидролиза АТФ для перемещения внутриклеточных грузов вдоль микротрубочек. Они обладают схожими последовательностями моторных доменов, но довольно значительно различаются по последовательности и структуре немоторных участков. Центромерный белок E (CENP-E) является представителем семейства кинезинов-7 и входит в состав кинетохора — крупного комплекса белков, расположенных на хромосоме. CENP-E участвует в захвате микротрубочек хромосомами и переносе хромосом к экватору клетки во время митотического деления. Особенностью CENP-E является нетипично длинный, частично суперспирализованный линкер. Согласно данным электронной микроскопии, его длина составляет около 230 нм. Биологическая роль этого необычного линкера неизвестна, но были высказаны предположения о том, что он может облегчать захват микротрубочек путем исследования большого цитоплазматического объема. Интересно, что мутант CENP-E с укороченным линкером не поддерживает нормальное разделение хромосом. Целью настоящей работы было исследование биомеханических характеристик белка CENP-E, для того чтобы определить, каковы особенности его транспорта в условиях приложения внешней силы и какова роль длинного линкера CENP-E в процессе переноса хромосом. Исследования проводили в проточной камере под микроскопом с использованием очищенного коровьего тубулина и очищенных рекомбинантных белков CENP-E *Xenopus laevis*. С помощью оптического пинцета мы измерили скорости и длины пробега отдельных молекул CENP-E по микротрубочке в зависимости от приложенной силы. Согласно нашим результатам, CENP-E ведет себя как активный транспортный мотор, по своим характеристикам близкий к хорошо изученному кинезину-1. Длинный немоторный участок CENP-E, несмотря на наличие на его конце дополнительного сайта связывания с микротрубочкой, не оказывал существенного влияния на транспортные характеристики белка CENP-E. Интересно, что вопреки нашим ожиданиям белок CENP-E переносил микросферы, имитирующие в нашем эксперименте хромосомы, будучи сложенными в компактную конфигурацию. С целью изучения этой сложной конформации CENP-E мы разработали подход, основанный на анализе флуктуаций микросферы во время ее транспорта белком CENP-E по микротрубочке. Кроме того, мы попытались «развернуть» белок CENP-E, прикладывая к нему боковые силы во время движения вдоль микротрубочек. Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о том, что обнаруженная нами свернутая конфигурация CENP-E устойчива к силам до 4 пН и не оказывает ингибирующего влияния на транспорт CENP-E вдоль микротрубочек. Мы предполагаем, что эта компактная конформация линкера CENP-E позво-

ляет более коротким белкам кинетохора эффективно закрепляться за микротрубочку одновременно с CENP-E во время транспорта хромосом вдоль микротрубочек, повышая надежность закрепления.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 14-04-31961 мол_а и 15-34-5054815 мол_нр).

ВЗАИМОСВЯЗЬ p53/p21- И MAP-КИНАЗНЫХ ПУТЕЙ В ПРОЦЕССЕ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОГО СТАРЕНИЯ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА. © П. И. Дерябин, А. В. Бородкина, Е. Б. Бурова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, pavel_derya-bin@list.ru

Мезенхимные стволовые клетки эндометрия человека (СКЭ) подвергаются преждевременному старению в условиях сублетального окислительного стресса. Ранее мы показали, что процесс H_2O_2 -индуцированного старения сопровождается активацией p53/p21- и p38 MAPK-сигнальных путей. Установлено, что киназа p38 участвует как в инициации, так и в развитии преждевременного старения СКЭ, тогда как подавление активности p38 специфическим ингибитором SB203580 частично предотвращает индукцию старения. Роль других членов суперсемейства MAP-киназ (ERK1/2 и JNK) в реализации старения СКЭ до сих пор не была исследована. С другой стороны, изучение взаимосвязи участников MAP-киназного каскада и p53/p21-пути может внести существенный вклад в понимание механизма регуляции преждевременного старения СКЭ. В работе анализировали взаимовлияние ERK1/2, JNK, p38 и p53, блокируя активность этих сигнальных белков специфическими ингибиторами U0126, SP600125, SB203580 и pifithrin- α (PFT) соответственно. Согласно полученным данным, через 30 мин после начала стимуляции H_2O_2 активировала все исследуемые белки; PFT вызывал существенное увеличение активации ERK1/2, JNK и p38. Однако ингибирование любой из MAP-киназ не оказывало эффекта на уровень фосфорилирования p53. Выявленные закономерности сохранились как минимум в течение 3 сут после окончания H_2O_2 -стимуляции. На основании этих результатов можно предположить существование однонаправленного влияния p53 на статус фосфорилирования исследуемых MAP-киназ. При оценке уровня экспрессии белка p21, транскрипционной мишени p53, было выявлено ожидаемое подавление экспрессии p21 в присутствии PFT, в то время как блокирование активности участников MAP-киназного каскада привело к значительному усилению экспрессии p21 по сравнению с H_2O_2 -стимулированными СКЭ. Эти наблюдения наводят на мысль о вовлеченности ERK1/2, JNK и p38 в регуляцию экспрессии p21 независимо от активации p53. Ингибирование p53, ERK1/2 и JNK не приводило к изменению H_2O_2 -индуцированной активации киназы MK-2 на коротких сроках (30 мин). Однако на длительных сроках (3 сут) мы наблюдали отчетливое уменьшение уровня фосфорилирования как p38, так и MK-2 в присутствии U0126, что предполагает зависимость активации p38 от уровня фосфорилирования ERK1/2. Полученные данные об активации участников семейства MAP-киназ и их взаимосвязи с p53/p21-сигнальным путем в перспективе послужат основой для выяснения вопроса о том, является ли функционирование

ERK1/2, JNK и p38 необходимым и достаточным условием реализации программы H_2O_2 -индуцированного старения СКЭ.

ДИПОЛЬНЫЕ МОДИФИКАТОРЫ БИСЛОЙНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН. © С. С. Ефимова, О. С. Остроумова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ssefimova@mail.ru

Дипольные модификаторы — это соединения, способные влиять на дипольный потенциал модельных и клеточных мембран. Этот скачок потенциала на границе раздела фаз бислой—раствор играет существенную роль в регуляции транспорта веществ через мембрану (Rokitskaya et al. Biophys. J., 2002; Luchian, Mereuta. Langmuir, 2006; Ostroumova et al. Langmuir, 2007, 2010; Lundbaek et al. PNAS, 2010; Ostroumova et al. PLoS ONE, 2012; Efimova et al. Langmuir, 2014; Chulkov et al. Biochim. biophys. acta, 2015; Ефимова и др. Цитология, 2015).

В работе на предмет способности изменять дипольный потенциал мембран протестированы различные флавоноиды, анестетики, миорелаксанты, тиреоидные гормоны, ксантеновые и стирилпиридиновые красители. Количественное описание модифицирующего действия флавоноидов, анестетиков, миорелаксантов, тиреоидных гормонов и ксантеновых красителей представлено в виде характеристических параметров изотермы адсорбции Ленгмюра: максимального уменьшения дипольного потенциала при насыщении и константы десорбции модификатора, отражающей его сродство к мембране. Определены коэффициенты наклона линейных зависимостей увеличения дипольного потенциала фосфолипидных бислоев от концентрации стирилпиридиновых красителей в мембраноомывающих растворах.

Установлены ряды эффективности дипольмодифицирующего действия протестированных флавоноидов, анестетиков, миорелаксантов, тиреоидных гормонов и ксантеновых красителей. Выявлена прямая корреляция изменения величины дипольного потенциала бислоев с гидрофобностью молекулы модификатора. Варьирование спонтанной кривизны фосфолипидного состава мембран позволило предсказать плоскость адсорбции различных дипольных модификаторов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-34-20356) и стипендии президента РФ (СП-69-2015.4).

МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ ФЛАВОНОИДОВ НА КАНАЛООБРАЗУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ ЭКЗОГЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ. © С. С. Ефимова, О. С. Остроумова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ssefimova@mail.ru

Флавоноиды являются растительными полифенолами, придающими вкус и цвет фруктам и овощам. Эти соединения характеризуются выраженной биологической активностью, связанной с их антиоксидантными, противоаллергическими и антимикробными свойствами (Yamamoto, Gaynor. J. Clin. Invest., 2001; Cushnie, Lamb. Int. J. Antimicrob. Agents, 2011). Исследования in vitro показали, что флавоноиды способны изменять плотность

упаковки липидных молекул в мембране (Ollila et al. Arch. Biochem. Biophys., 2002; Tarahovsky et al. Mol. Cell Biochem., 2008), ее дипольный потенциал (Cseh, Benz. Biophys. J., 1998; Efimova, Ostroumova. Langmuir, 2012) и фазовое разделение (Ostroumova et al. Chem. Phys. Lipids, 2014).

В работе суммированы результаты исследования влияния флавоноидов на каналобразующую активность противогрибкового липопептида *Pseudomonas syringae* сирингомицина E; липопептида *Bacillus subtilis* сурфактина; макролидных полиеновых антибиотиков, продуцируемых *Streptomyces*, амфотерицина B, нистатина и филипина; антибактериальных пептидов *Hyalophora cecropia* цекропинов; альфа-гемолизина *Staphylococcus aureus*; амилоидогенных пептидов, фрагментов β-амилоидного пептида и прионного белка, а также пресенилинов в плоских липидных бислоях. Обобщение полученных результатов позволило предложить модель мембранной активности флавоноидов, включающую в себя опосредованное липидом действие флавоноидов на каналы и взаимодействие модификаторов с порообразующими молекулами.

В частности, установлено, что дипольный потенциал мембраны влияет на каналобразующую активность липопептидов и цекропинов. Выявлено, что 5- и 4'-гидроксилированные флавоноиды взаимодействуют с сенсором напряжения альфа-гемолизинной поры. Каналообразующая активность макролидных полиенов определяется суперпозицией двух факторов: величиной дипольного потенциала мембран и стабильностью порообразующих полиен-стериновых комплексов в присутствии флавоноидов. Показано непосредственное влияние флавоноидов на агрегационную способность амилоидных и амилоидоподобных пептидов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-31738) и стипендии президента РФ (СП-69-2015.4).

РОЛЬ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ АДГЕЗИОННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ, ОПОСРЕДОВАННЫХ Е-КАДХЕРИНОМ, В МИГРАЦИИ НЕОПЛАСТИЧЕСКИХ КЛЕТОК.
© И. Ю. Житняк, С. Н. Рубцова, Н. А. Глушанкова. Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва, natglu@hotmail.com

Межклеточные адгезионные контакты, образованные E-кадхерином, являются основой стабильной межклеточной адгезии в эпителиальной ткани. В настоящее время общепринятым является представление о том, что угнетение экспрессии E-кадхерина, лежащее в основе эпителиально-мезенхимального перехода, определяет прогрессию опухолей эпителиального происхождения и является необходимым звеном для инвазии раковых клеток. Сниженная экспрессия E-кадхерина рассматривается в качестве неблагоприятного прогностического маркера, связанного с инфильтративным ростом опухоли и ее метастазированием. Вместе с тем в ряде карцином — протоковых карциномах молочной железы, колоректальных карциномах и карциномах простаты — сохраняются экспрессия E-кадхерина и его аккумуляция на плазматической мембране. Скорее всего, значение E-кадхерина для биологии опухолевой клетки может быть более сложным, поэтому в последнее время обсуждается не только опухолесупрес-

сорная роль E-кадхерина, но также и его возможное значение для инвазии, роста и выживаемости клеток карцином. Ранее мы обнаружили, что трансформированные химическими канцерогенами или мутантным онкогеном Ras эпителиальные клетки IAR могут сохранять экспрессию E-кадхерина и встраивать его в адгезионные контакты. Мы впервые показали, что адгезионные контакты трансформированных клеток в отличие от адгезионных контактов нормальных эпителиальных клеток ассоциированы с прямыми актиновыми пучками и являются нестабильными структурами. С другой стороны, адгезионные контакты, образованные E-кадхерином, в отличие от контактов, образованных N-кадхерином, могут объединять неопластические клетки в группы, имеющие общий вектор движения. Коллективная миграция может быть эффективным способом диссеминации опухолевых клеток. Нами было высказано предположение о способности опухолевых клеток к образованию смешанных адгезионных контактов с нормальными эпителиальными клетками. С помощью конфокальной микроскопии мы исследовали поведение эпителиальных клеток трансформированных линий IAR, различающихся по экспрессии E- и N-кадхерина, при расходе на плотный монослой нормальных эпителиальных клеток линии IAR-2. В работе были использованы клетки линий IAR-6-1, сохранившие E-кадхерин, клетки линий IAR1170D11, F9 и H5, экспрессирующие E-кадхерин и N-кадхерин, и клетки линий IAR1162C4, D3, F4, утратившие E-кадхерин, но экспрессирующие N-кадхерин. Были получены стабильные линии, экспрессирующие флуоресцентные белки GFP и mKate2, а также линии, экспрессирующие GFP-E-кадхерин, распределение которого в клетках совпадало с распределением эндогенного E-кадхерина. Мы обнаружили, что клетки линий IAR-6-1 и IAR1170 способны формировать смешанные динамичные E-кадхериновые контакты с нормальными эпителиоцитами IAR-2. Трансформированные эпителиоциты, сохранившие E-кадхерин, могли мигрировать по поверхности эпителиального монослоя IAR-2 и инвазировать монослой на границах между нормальными эпителиоцитами. При разрушении адгезионных взаимодействий в результате экзогенной экспрессии в трансформированных эпителиоцитах доминантно-негативного мутанта E-кадхерина наблюдалось резкое угнетение миграционных характеристик неопластических клеток. Можно предположить, что обнаруженные нами адгезивные взаимодействия между неопластическими и нормальными клетками важны для миграции раковых клеток в эпителиальных структурах на этапах метастазирования.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ РОСТА МИКРОТРУБОЧЕК В ФИБРОБЛАСТЕ. © Е. И. Зворыкина,¹ А. В. Творогова,² И. А. Воробьев.^{1,2} ¹ Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, ² Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, ivorobjev@mail.ru

Для большинства типов животных клеток предполагается, что основным центром организации микротрубочек (МТ) является центросома. Однако известно, что нуклеация МТ может происходить независимо от центросомы. В настоящей работе было проведено исследование пространственной организации роста МТ в клетке. Расту-

щие концы МТ в фибробластах 3Т3 визуализировались в результате трансфекции клеток плазмидой плюс-концевого белка МТ EB-3. Движение «комет» флуоресцирующего белка в клетке оценивали с помощью цейтраферной съемки на флуоресцентном микроскопе. Всего в 24 клетках было проанализировано 1820 треков МТ, расположенных в разных областях клетки. Продолжительного роста МТ от центра клетки до края не наблюдалось. Средняя длина трека в эндоплазме составила 5.6 ± 2.8 , а на краю клетки — 3.8 ± 1.2 мкм. Средняя продолжительность периодов роста в эндоплазме и на краю клетки составляла 20.7 ± 9.2 и 16.3 ± 5.9 с соответственно. Общее число новых треков, возникающих в цитоплазме, составило 642 ± 156 событий в 1 мин. Точки начала эпизодов роста в цитоплазме были расположены неоднородно. Наибольшая плотность активных плюс-концов наблюдалась в области ведущего края клетки, где она составила 0.7 на 1 мкм^2 . В более глубоких слоях цитоплазмы плотность растущих концов МТ снижалась до 0.06 на 1 мкм^2 . Центросома как область в околоядерной зоне с высокой яркостью флуоресценции EB-3 выявлялась не во всех клетках (15 из 24). Клетки, в которых наблюдалась яркая центросома, обладали значительно меньшим диаметром по сравнению с клетками без явной видимой области центросомы. (32.5 ± 9.3 мкм, $n = 15$ против 63.0 ± 15.5 мкм соответственно, $n = 9$). От центросомы отходили протяженные треки (длиной более 1 мкм). Средняя интенсивность нуклеации МТ от центросомы, определяемая таким образом, составила 17.7 ± 8.6 события в 1 мин. Центросомальные МТ росли изотропно, 28 % треков росло под углом менее 30° к ведущему краю клетки. Таким образом, вклад центросомальных МТ в общую популяцию растущих МТ в клетке составил менее 5 %, а большая часть треков МТ образовывалась в цитоплазме клетки. Помимо центросомы в цитоплазме всех рассматриваемых клеток выявлялись 1—2 (иногда до 3—5) компактные области, из которых начинали свой рост МТ в различных направлениях. Среднее число треков, начинавшихся в этих областях, составило 6.8 ± 2.1 события в 1 мин. Такие области располагались в основном на периферии клетки. Для МТ, растущих из подобных областей в цитоплазме, был характерен рост в разных направлениях, но более упорядоченный по сравнению с центросомальными МТ, 42 % треков росло под углом менее 30° к ведущему краю клетки. Средние длины периодов роста МТ, образующихся в области центросомы (5.0 ± 2.8 мкм, $n = 350$) и в областях сгущения роста (4.3 ± 2.1 мкм, $n = 91$) в цитоплазме, достоверно не различались и были значительно меньше радиуса клеток. Средняя продолжительность периодов роста и средняя скорость также были сходными для обеих рассматриваемых групп МТ (19.4 ± 9.3 с против 16.8 ± 7.5 с и 15.5 ± 3.4 против 15.3 ± 5.0 мкм/мин соответственно). Таким образом, рост МТ в эндоплазме и в области центросомы по своим характеристикам не различается, а на краю клетки продолжительность периодов роста МТ снижается в 1.5 раза.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-40189-Н).

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ ЦИТОКЕРАТИНОВЫХ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ФИЛАМЕНТОВ В КЛЕТКАХ ТРОФОБЛАСТА И ИХ РОЛЬ ПРИ ПЛА-

ЦЕНТАЦИИ У ВОСТОЧНОЕВРОПЕЙСКОЙ ПОЛЕВКИ *MICROTUS ROSSIAEMERIDIONALIS*. © Т. Г. Зыбина,¹ Г. И. Штейн,¹ К. М. Пожарисский,² Е. В. Зыбина.¹ ¹ Институт цитологии РАН, zybina@mail.cytspb.rssi.ru, и ² Институт радиологии и хирургических технологий Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург.

При плацентации у восточноевропейской полевки *Microtus rossiaemeridionalis*, как и у других видов грызунов, инвазивные высокоэндополиплоидные (8с—1024с) вторичные клетки трофобласта (ВГКТ) вначале образуют непрерывный слой на границе с материнской и фетальной частями плаценты, однако пути инвазии трофобласта у этого вида значительно отличаются от других видов грызунов. В настоящей работе с применением иммуноочерчения цитокератина и белка Ki-67, а также цитофотометрии ДНК и PAS-реакции исследованы пути инвазии различных по плоидности, способности к пролиферации, локализации цитокератиновых филаментов и функциональным особенностям популяций клеток трофобласта. У полевки начиная с середины беременности кластеры низкополиплоидных клеток трофобласта соединительной зоны (СЗ) плаценты прерывают слой ВГКТ главным образом в середине плацентарного диска и поэтапно замещают этот слой. В результате этого процесса на границе с *decidua basalis* роль барьера между семиаллогенными организмами матери и плода переходит к специфической популяции богатых гликогеном низкополиплоидных (2с—16с) краевых клеток СЗ, которые, превосходят уровень плоидности более глубоко лежащих популяций трофобласта СЗ — веретеновидных и пролиферативных. Все вышеперечисленные субпопуляции клеток трофобласта цитокератин-позитивны. *Decidua basalis* в основном не обнаруживает окрашивания цитокератина, за исключением интерстициально и эндovasкулярно инвазирующего трофобласта. Особенно интенсивное иммуноокрашивание наблюдается в ВГКТ на периферии цитоплазмы и в длинных отростках. Часто ВГКТ, будучи погруженными в глубь СЗ, окружают длинными отростками кластеры веретеновидных и пролиферативных клеток, отделяя последние друг от друга. Тесно контактируя друг с другом с помощью отростков, ВГКТ создают каркас СЗ, в который заключены другие субпопуляции трофобласта; кроме того, ВГКТ выстилают лакуны с материнской кровью. Скопления тесно прилегающих друг к другу ВГКТ сохраняются в латеральной части плацентарного диска, вероятно создавая его плотную внешнюю оболочку. Субпопуляции «краевых», веретеновидных и пролиферативных клеток трофобласта обнаруживают менее интенсивное окрашивание цитокератина, который, однако, также локализован в основном на периферии цитоплазмы, повторяя границы тесно прилегающих друг к другу клеток. «Потоки» веретеновидных клеток мигрируют единым пластом в направлении *decidua basalis*. Для пролиферативных клеток характерно присутствие плотного пучка цитокератиновых филаментов, окружающего ядро с одной стороны. Таким образом, инвазия низкополиплоидных клеток трофобласта в глубь *decidua basalis* у полевки, по-видимому, играет большую роль в установлении фето-материнского взаимодействия, чем при плацентации у мыши и крысы. В свою очередь высокоэндополиплоидные ВГКТ, контактируя друг с другом своими длинными отростками, содержащими массивные пучки цитокератиновых филаментов, отделяют друг от друга кластеры функционально различных субпопуляций кле-

ток трофобласта СЗ, а также образуют каркас системы лакун с материнской кровью, тем самым обеспечивая свободный приток крови к лабиринту, где осуществляются питание эмбриона и газообмен.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы ФАНО «Молекулярная и клеточная биология».

МЕМБРАНОТРОПНАЯ АКТИВНОСТЬ ОЛИГОПЕПТИДНОГО ФРАГМЕНТА АЛЬФА-ДЕФЕНСИНОВ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ. © В. П. Иванова,¹ З. В. Ковалева.² ¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, valet@iephb.ru, и ²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Дефенсины, как известно, представляют собой природные пептидные антибиотики с высокой фунгицидной и бактерицидной активностью. В последнее время накапливаются сведения о влиянии дефенсинов на ряд физиологических функций, не связанных с иммунным ответом. В частности, установлено, что дефенсины участвуют в регуляции процессов ранозаживления и активации клеточной пролиферации. Не исключено, что в указанные процессы могут быть вовлечены не только исходные молекулы дефенсинов, но и их фрагменты, высвобождаемые в ходе их неполного расщепления в тканевой жидкости многоклеточных организмов. Ранее нами установлено, что тетрапептидный (ТП) фрагмент α -дефенсинов участвует в регуляции адгезивных свойств клеток. В настоящей работе исследовали влияние ТП на структуру клеточной мембраны. В частности, нас интересовал вопрос о том, может ли ТП изменять фосфолипидный состав клеточных мембран и структуру самих фосфолипидных молекул. В работе использовали эпителиоподобную линию клеток СНО-К1. Пептид (10^{-7} М) добавляли в среду культивирования за 24 ч до окончания инкубации клеток. Липиды экстрагировали по методу Фолча. Фосфолипиды разделяли на фракции методом двухмерной ТСХ. Состав метиловых эфиров жирных кислот определяли методом ГЖХ. Показано, что ТП практически не изменял состава фосфолипидов в клеточных мембранах, но модифицировал жирнокислотный состав фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина и фосфатидилинозита. Инкубация клеток с ТП приводила к изменению спектра ненасыщенных жирных кислот в составе исследованных фосфолипидов, при этом количество моноеновых и (или) диеновых кислот увеличивалось, а доля полиеновых кислот уменьшалась. Прирост моноеновых и (или) диеновых ацильных остатков и уменьшение доли полиеновых жирнокислотных остатков в составе основных классов фосфолипидных молекул, локализованных в определенных микродоменах мембран, могут привести к уплотнению последних, что повлечет за собой изменение скорости кластеризации интегриновых рецепторов, сборки адгезионных комплексов и в конечном итоге обеспечит усиление адгезивных свойств клеток, подвергнутых воздействию исследованным пептидом

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ МИКРОТРУБОЧЕК НА ПОДВИЖНОСТЬ ФИБРОБЛАСТОВ. © Ш. Кауанова,¹ Л. Ш. Измайлова,² А. Балабиев,¹ А. В. Творогова,³ И. А. Воробьев.^{2,3} ¹Национальная лаборатория, Астана, Казахстан, ²Биологический факультет Московского госу-

дарственного университета им. М. В. Ломоносова и ³ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, ivorobjev@mail.ru

Важную роль в движении фибробластов и многих раковых клеток играют микротрубочки (Vasiliev M. et al., 1970. J. Embryol. Exp. Morphol. 24 : 625). В настоящее время ингибиторы микротрубочек используются при лечении онкологических заболеваний. Целью данной работы является изучение влияния различных концентраций ингибиторов микротрубочек на движение клеток с целью определения пороговых эффектов. В работе проведено исследование воздействия трех различных по механизму действия ингибиторов микротрубочек (нокодазола, таксола и винорельбина) на миграцию фибробластов 3Т3 на модели застывания экспериментальной раны. Съемку проводили на инвертированном микроскопе спустя 1 ч после момента нанесения раны в 24-луночных планшетах с интервалом 20 мин в течение 16—24 ч при 37 °С. Клетки инкубировали в среде, независимой от содержания CO₂. Концентрация каждого ингибитора варьировала от 1 до 300 нМ. Клетки в контроле и при воздействии ингибиторов выползают в экспериментальную рану практически равномерно на протяжении 6—10 ч со скоростью около 7 мкм/ч. Доза 1—3 нМ любого из ингибиторов не влияет на скорость клеток, а для концентрации 6 нМ эффект статистически недостоверен. При добавлении 10 нМ нокодазола, винорельбина или таксола скорость клеток достоверно снижалась по сравнению с контролем. В диапазоне концентраций ингибиторов от 10 до 50 нМ эффект зависел от концентрации каждого ингибитора. В концентрации 10 нМ наибольший эффект оказывал таксол, в концентрации 30 нМ эффект всех трех ингибиторов был сходным, а в концентрации 50 нМ наибольший эффект оказывал винорельбин. В диапазоне от 50 до 300 нМ эффект ингибиторов практически одинаков — скорость снижалась в 4 раза для нокодазола и винорельбина и в 3 раза для таксола и не зависела от их концентраций. Анализ динамики микротрубочек на тех же клетках, трансфицированных EB-1-RFP, показал, что винорельбин эффективно тормозит рост микротрубочек начиная с концентрации 10 нМ, нокодазол — начиная с концентрации 100 нМ. В этих концентрациях значительно уменьшается число треков растущих в клетках микротрубочек и снижается средняя длина отдельного трека. Эффект таксола в основном связан с перераспределением микротрубочек в сторону края клетки, но не с их динамикой. Заметное перераспределение треков роста микротрубочек под действием таксола проявляется начиная с концентрации 100 нМ. Таким образом, подвижность клеток 3Т3 в целом коррелирует со стабилизацией микротрубочек, но является более чувствительным тестом на анализ эффекта митостатиков в пороговых концентрациях.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы «Развитие трансляционной и персонализированной медицины для создания основ биомедицинской индустрии в Республике Казахстан на 2014—2016 годы» (№ 0212/ПЦФ-14-ОТ) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-40189-Н).

ЭНТОЗ В КЛЕТКАХ КУЛЬТУРЫ MCF7 ПРИ ДЕЙСТВИИ ПАКЛИТАКСЕЛА. © О. П. Кисурин-Евгеньева, И. В. Мамичев, Г. Е. Онищенко. Биологический факультет Московского государственного ун-та им. М. В. Ломоносова, evgengeva@mail.ru

Энтоз (один из вариантов клеточного каннибализма) представляет собой внедрение одной опухолевой клетки в другую. При этом поглощенная клетка остается живой на протяжении некоторого времени внутри крупной энтозной вакуоли. Судьба поглощенной клетки может быть различной: гибель путем лизосомерноопосредованной деградации, вступление в митоз и (или) выход из энтозной вакуоли. Физиологическое значение энтоза в опухолевой прогрессии во многом остается неясным. С одной стороны, деградировавшая в ходе энтоза клетка может служить источником питательных веществ для клетки-каннибала. С другой стороны, энтозная вакуоль может защищать внедрившуюся клетку от воздействия химиотерапевтических препаратов и таким образом способствовать ее выживанию. В работе проведено исследование особенностей энтоза в культуре опухолевых клеток MCF-7 при воздействии химиотерапевтического препарата паклитаксела (125 нм, 24 и 48 ч), вызывающего гиперполимеризацию микротрубочек, вступление клеток в К-митоз и образование клеток с микроядрами. Воздействие паклитакселом не приводит к увеличению каннибалического индекса (1.2 ± 0.9 (24 ч) и 1.9 ± 0.6 (48 ч)) по сравнению с контролем (1.2 ± 0.9 %). В присутствии паклитаксела поглощать и внедряться могут как одноядерные, так и микроядерные клетки; клетки с микроядрами являются более удобной мишенью для внедрения. Паклитаксел вызывает гиперполимеризацию микротрубочек в клетках—каннибалах, но не в поглощенных клетках. В контроле в процессе энтоза формируются адгезионные контакты, которые разрушаются на поздних стадиях деградации поглощенной клетки; в присутствии паклитаксела нарушается деградация одного из белков адгезивных контактов — β -катенина — на мембране энтозной вакуоли, что может быть опосредовано нарушением внутриклеточного транспорта с участием микротрубочек. Воздействие паклитакселом не влияет на активность лизосомного компартмента поглощенных клеток и не препятствует лизосомной деградации. В целом воздействие паклитакселом на клетки культуры MCF-7 не препятствует внедрению, поглощению и деградации клеток. При этом в поглощенной клетке не происходит гиперполимеризации микротрубочек. Этот факт может свидетельствовать о том, что клетка в составе энтозной вакуоли защищена от действия некоторых химических факторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-50-00029).

ЦИТОСКЕЛЕТ В ОБОНЯТЕЛЬНЫХ РЕЦЕПТОРНЫХ КЛЕТКАХ У ГЛУБОКОВОДНЫХ РЫБ ОЗЕРА БАЙКАЛ ПРИ РАЗНЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ НАГРУЗКАХ. © И. В. Клименков,^{1,2} М. В. Пастухов,³ Н. П. Судяков,^{2,4,5} Н. С. Косицын.⁶ ¹ Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, ² Иркутский государственный университет, ³ Институт геохимии им. А. П. Виноградова СО РАН, Иркутск, ⁴ Иркутский научный центр хирургии и травма-

тологии, ⁵ Иркутский научный центр СО РАН и ⁶ Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва.

Молекулярные механизмы регуляции сборки цитоскелета и его участие в обеспечении рецепторных свойств обонятельных клеток представляют собой актуальную проблему нейробиологии (Burton, 1992). Для выявления цитологических основ устойчивого функционирования нейронов, эволюционно приспособленных к обеспечению хеморецепции на разных водных глубинах, исследовали ультраструктурные особенности микротубулярного аппарата в дендритах рецепторных клеток у трех генетически близких видов байкальских *Cottoidei* — у желтокрылой широколобки *Cottocomephorus grevingki* во время нереста и в межнерестовый период, а также у глубоководных рыб — пелагической большой голомянки *Comephorus baicalensis* и жирной широколобки *Batrachocottus nikolskii*, обитающей в придонном слое озера до больших глубин (1600 м). С помощью методов электронной микроскопии показано, что у желтокрылых бычков цитоскелет в дендритах обонятельных нейронов приобретает наиболее четкую структурированность в нерестовый период, когда они находятся в прибрежной зоне озера — при настройке обонятельной системы на восприятие половых феромонов. Предполагается, что такая развитая система микротрубочек необходима для транспорта молекулярных рецепторов и ферментов, необходимых для обеспечения повышенной чувствительности клеток к половым феромональным сигналам. Кроме того, установлено, что микротрубочки в дендритах хеморецепторных клеток рыб появляются после их длительного содержания в чистой, обедненной органическими веществами воде. В данных условиях формирование микротрубочек происходило на фоне значительного снижения электронной плотности цитоплазмы и существенного уменьшения развития других внутриклеточных органелл. Из этого следует, что хорошо организованная система цитоскелета в дендритах чувствительных клеток является необходимым фактором поддержания их структурной целостности при дефиците сенсорных сигналов. В частности, эти факты указывают на то, у глубоководных рыб, обитающих в обедненной органическими веществами пелагиали озера, микротрубочки обеспечивают стабильность структурно-функционального состояния дендрита у клеток, не вовлеченных в данных условиях в активные процессы хеморецепции. Таким образом, цитоскелет принимает высокоструктурированную форму не только при значительных функциональных нагрузках ольфакторной системы в период нереста, но и в условиях низкого содержания в воде химических агентов. В целом цитологические исследования свидетельствуют о том, что уровень развития элементов цитоскелета в рецепторных клетках как у прибрежных, так и у глубоководных рыб индивидуален и существенно зависит от химизма водной среды и образа жизни. Результаты, полученные на модельных гидробионтах с экстремальными по глубине условиями существования, могут иметь важное значение для понимания фундаментальных механизмов, обеспечивающих стабильное функционирование обонятельных клеток при изменении химического состава водной среды и режимов гидростатических давлений.

Авторы выражают благодарность команде ГОА МИР за помощь в сборе материала.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 11-04-01231-а и 12-04-10007-к).

УЧАСТИЕ МУСКАРИНОВЫХ И НИКОТИНОВЫХ ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ СИНХРОННОСТИ СЕКРЕЦИИ АЦЕТИЛХОЛИНА ИЗ ДВИГАТЕЛЬНЫХ НЕРВНЫХ ОКОНЧАНИЙ ЛЯГУШКИ. © И. В. Ковязина,^{1,2} А. Н. Ценцевичский,^{1,2} Е. Е. Никольский.^{1,2}
¹ Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, ikov2000@mail.ru, и ² Казанский (Приволжский) федеральный университет.

В предыдущих исследованиях (Kovyzina et al., 2010) нами было показано, что в ходе высокочастотной стимуляции двигательного нерва изменение квантового состава синаптических ответов сопровождается нарушением синхронности секреции ацетилхолина (АХ). В протяженных нервно-мышечных окончаниях амфибий десинхронизация секреторного процесса обусловлена как минимум двумя факторами — модуляцией процесса освобождения медиатора в отдельных активных зонах и снижением скорости проведения возбуждения по немиелинизированному участку аксона. В данном исследовании проверяли гипотезу, согласно которой описанные изменения секреции АХ могут быть обусловлены активацией пресинаптических холинорецепторов никотинового либо мускаринового подтипа. Эксперименты проводили на нервно-мышечных препаратах (*m. sartorius*) лягушек *Rana ridibunda*. Регистрировали токи концевой пластинки (ТКП) при ритмической стимуляции нерва с низкой (0.5 имп/с) и высокой (100 имп/с) частотами при физиологическом уровне Ca^{2+} в среде. О степени синхронности секреции судили по соотношению длительностей переднего фронта многоквантовых ТКП и спонтанных одноквантовых сигналов, зарегистрированных до и после ритмической стимуляции. Время проведения возбуждения по терминали оценивали путем двухэлектродного экстраклеточного ответа пресинаптических потенциалов действия. Высокочастотная стимуляция нерва (100 имп/с, 1 с) приводила к увеличению длительности переднего фронта ТКП (в среднем на 15 %), что при неизменности параметров одноквантовых ТКП может свидетельствовать о десинхронизации процесса выделения АХ. Это увеличение длительности фазы роста ТКП было менее выражено в присутствии блокаторов никотиновых холинорецепторов — неселективного d-тубокурарина (100 нМ) и антагониста $\alpha 7$ рецепторов метилликаконитина (MLA, 10 нМ), а также при аппликации блокаторов мускариновых рецепторов подтипа M1 (пирензепина, 100 нМ, и VU0255035, 100 нМ). Анализ скорости проведения возбуждения по нервным окончаниям показал, что при высокочастотной стимуляции нерва в присутствии блокаторов Н-холинорецепторов d-тубокурарина и MLA этот параметр изменялся в меньшей степени по сравнению с контролем. В присутствии мускариновых антагонистов (атропина, VU 0255035) каких-либо изменений скорости проведения возбуждения выявлено не было, т. е. изменение синхронности секреции АХ, опосредованное через активацию холинорецепторов подтипа M1 в ходе пачки импульсов, связано с изменением кинетики секреции на уровне отдельных активных зон. Таким образом, АХ, секретлируемый из двигательных нервных окончаний лягушки при высокочастотной активности, может модулировать не только

интенсивность, но и синхронность своего освобождения. Изменение степени синхронности секреции в ходе пачки импульсов связано с двумя факторами — снижением скорости проведения возбуждения при активации никотиновых рецепторов и изменением кинетики секреции в отдельных активных зонах при активации М-холинорецепторов.

Работа выполнена в рамках государственной финансовой поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров и при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-00987).

НЕКАНОНИЧЕСКИЙ АФФЕРЕНТНЫЙ СИНАПС ВКУСОВЫХ КЛЕТОК. © С. С. Колесников. Институт биофизики клетки РАН, Пущино, staskolesnikov@yahoo.com

Вкусовые клетки типа II — основной тип хемосенсорных клеток вкусовой почки млекопитающих — специализируются в распознавании горьких и сладких стимулов и аминокислот. Поскольку клетки типа II образуют классических химических синапсов с окончаниями вкусового нерва, долгое время оставалось неясным, каким образом в этих вкусовых клетках кодируется сенсорная информация и осуществляется ее афферентная нейротрансдача. Исследования последних лет, проведенные в нашей лаборатории и зарубежными коллегами, позволили установить, что вкусовые клетки типа II используют неканонический механизм для афферентной нейротрансдачи вкусовой информации вкусовому нерву. Оказалось, что эти клетки используют в качестве нейротрансмиттера АТР, который секретруется в экстраклеточное пространство, чтобы стимулировать постсинаптические рецепторы P2X, Ca^{2+} -независимым и потенциалзависимым образом при участии АТР-проницаемых ионных каналов. До недавнего времени считалось, что этот канал формируется канальным белком паннексином 1 (Panx1) и (или) канальными белками из семейства коннексинов. Полученные нами данные позволили исключить Panx1. В конце 2013 г. было показано (Tagano et al., 2013), что генетический нокаут гена *CALHM1*, кодирующего канальный белок, приводит к подавлению стимулзависимой секреции АТР вкусовыми клетками, а также к потере вкусовой чувствительности у генетически модифицированных мышей. Эти факты свидетельствовали о том, что именно *CALHM1* является ключевой субъединицей АТР-проницаемого канала вкусовых клеток, хотя молекулярная структура последнего доподлинно все еще неизвестна. Обращало на себя то обстоятельство, что стимулы, вызывающие секрецию АТР, т. е. открывающие АТР-проницаемые каналы, не вызывали во вкусовых клетках типа II сколь-нибудь значимых Ca^{2+} -сигналов, ассоциирующихся со входом наружного Ca^{2+} . Между тем трудно придумать молекулярную организацию водной поры неселективного ионного канала, каковым является *CALHM1*, способного пропускать АТР-анион (507 Да, ~ 14 Å) и ряд заряженных красителей сопоставимой массы, но не пропускающего ион Ca^{2+} (40 Да, > 7 Å даже с гидратной оболочкой). В поисках объяснения этого противоречия мы обратили внимание на данные электронной микроскопии, в соответствии с которыми во вкусовых клетках типа II

имеется атипичная митохондрия, примыкающая к плазматической мембране в месте ее сопряжения с нервным окончанием. Мы предположили, что эта митохондрия со-локализована с АТР-проницаемыми каналами, образуя локальный компартмент субмикронных размеров для секреции АТР, в котором поддерживается независимый от остальной части клетки уровень АТР и Ca^{2+} . Эта правдоподобная модель могла бы, в частности, объяснить, почему открывание АТР-проницаемых каналов не приводит к изменению тотального Ca^{2+} в цитоплазме вкусовой клетки типа II. Проведенные исследования с использованием различных методов биологии клетки позволили получить результаты, которые свидетельствуют в пользу существования специализированного митохондриального компартмента, обеспечивающего в клетках типа II контролируемую секрецию АТР.

ИССЛЕДОВАНИЕ АНОКТАМИНОВ ОБОНЯТЕЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ МЫШИ. © А. С. Колесникова, М. Ф. Быстрова. Институт биофизики клетки РАН, Пущино, mmbistrova@icb.psn.ru

Хлорные каналы, активируемые кальцием, являются составным компонентом трансдукции сигнала в обонятельных нейронах. Через них осуществляется выход ионов хлора из клетки, способствующий деполяризации клеточной мембраны. Известно, что два представителя семейства аноктаминов (Ано1 и Ано2) формируют кальцийзависимые хлорные каналы в различных клеточных типах. К настоящему времени установлено, что Ано2 локализован в цилиях обонятельных нейронов, и получены доказательства того, что этот белок отвечает за кальций-активируемые хлорные токи в этих клетках (Stephan et al., 2009; Sagheddu et al., 2010). Белок Ано1 был ранее найден в вомероназальных нейронах, отвечающих за детекцию феромонов, и не обнаружен в обонятельном эпителии (Dibattista et al., 2012). В данной работе мы исследовали экспрессию мРНК гена Ано1 и локализацию обоих аноктаминов в обонятельном эпителии трансгенных мышей OMP-GFP. У этих генетически модифицированных мышей зеленый флуоресцентный белок GFP экспрессирован под контролем промотора обонятельного маркерного белка OMP. Поскольку OMP является маркером зрелых обонятельных нейронов, все дифференцированные обонятельные нейроны, установившие контакт с обонятельной луковицей, у мышей OMP-GFP обладают зеленой флуоресценцией. Экспрессию мРНК гена Ано1 исследовали с помощью метода обратнотранскриптазной ПЦР с ген-специфическими праймерами, соответствующими двум транскрипт-вариантам Ано1 из базы данных NCBI (NM_178642.5 и NM_001242349.1). Мы обнаружили, что в обонятельном эпителии мыши экспрессированы оба транскрипт-варианта гена Ано1. Для иммулокализации аноктаминов в обонятельном эпителии были использованы кроличьи анти-Ано1 (ACL-011; Alomone Labs) и анти-Ано2 (LS-B4615; LSBio) антитела и вторичные анти-кроличьи IgG, меченные AlexaFluor-647 (Ambion). На одном и том же срезе мы можем увидеть, локализован ли аноктамин (красная флуоресценция) в зрелых обонятельных нейронах, обладающих зеленой флуоресценцией, или в других клеточных типах, включая незрелые нейроны, а также опорные и базальные клетки. На конфокальных изображениях гистологических срезов обонятельного эпителия хорошо видно, что иммунореактив-

ность к Ано1, детектируемая по красной флуоресценции, имеет мембранную локализацию. Анализ совмещения зеленой и красной флуоресценции позволяет сделать заключение о том, что Ано1 локализован в цитоплазматических мембранах не только зрелых обонятельных нейронов, но и в незрелых нейронах, а также в базальных клетках. Таким образом, в данной работе мы впервые получили доказательства присутствия Ано1 в цитоплазматических мембранах обонятельных нейронов и базальных клеток. В соответствии с результатами ранее проведенных исследований (Dibattista et al., 2012) иммунореактивность к Ано2 была обнаружена нами в области обонятельных цилий на поверхности обонятельного эпителия. Несоответствие с данными, полученными ранее, заключается в том, что мы детектируем красную иммунофлуоресценцию Ано2 не только в области обонятельных цилий на поверхности эпителия, но и в цитоплазматических мембранах тел зрелых и незрелых нейронов, а также в мембранах базальных клеток. Известно, что генетический нокаут Ано2 влияет на кальцийактивируемые хлорные токи в обонятельных нейронах. Однако ответы на запахи у нокаутных мышей все же сохранялись, хотя и не в полном объеме, и это указывает на то, что кроме Ано2 в обонятельных нейронах должны быть еще и другие компоненты, ответственные за хлорные токи. Таким недостающим компонентом может быть Ано1.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-00913).

ОЦЕНКА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ С ЦИТОХАЛАЗИНОМ В. © Г. П. Косякова. Всероссийский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных РАСХН, Санкт-Петербург—Пушкин.

Для определения дестабилизации генома периферической крови коров черно-пестрой породы использовали цитокINETический блок культивируемых мононуклеаров с цитохалазином В, так как он разрушает микротрубочки клеток. Метод основан на определении частот микроядер в двуядерных клетках. Для определения микроядер в лимфоцитах коров 5 капель крови вносили в культуральные планшеты, содержащие по 1 мл среды с 20 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2.5 % ФГА, 2 г/л бикарбоната натрия и смесь антибиотиков, и культивировали в термостате. В часть проб через 44 ч инкубации вносили цитохалазин В. Еще через 24 ч культуры обрабатывали 0.125 М хлоридом калия в течение 6 мин, первым фиксирующим раствором (этанол, 0.9 % хлорида натрия и ледяная уксусная кислота в соотношении 12 : 13 : 1) в течение 8 мин и вторым фиксирующим раствором (этанол и ледяная уксусная кислота в соотношении 4 : 1) в течение 1 мин проводили трижды и центрифугировали. Приготовленные на стекле препараты окрашивали по Гимза разведенным фосфатным буфером. Микроядра подсчитывали в би- и мононуклеарных клетках при увеличении 500×. Из полученных результатов видно, что в контрольной культуре лимфоцитов коров отсутствовали двуядерные или многоядерные клетки, частота мононуклеаров (лимфоцитов с одним ядром округлой формы) варьировала от 0 до 17 % у высокопродуктивных животных. В среднем в контрольной культуре лимфоцитов частота

клеток с микроядрами была выше, чем в опытной культуре одноклеточных лимфоцитов, на 0.95 % у низкопродуктивных коров (до 5000 кг молока по наивысшей лактации) и на 1.81 % у высокопродуктивных коров (свыше 5000 кг молока по наивысшей лактации) соответственно. В контрольной и опытных культурах лимфоцитов коров микроядра выявлены и в мононуклеарных, и в бинуклеированных клетках. В контрольной культуре спонтанная частота лимфоцитов с микроядрами (ЧЛМ) варьировала от 0 до 17 %, а в опытной культуре — от 1.5 до 17.5 %. Частота бинуклеированных лимфоцитов с микроядрами изменялась от 2.8 до 33 %. Необходимо отметить, что у коров с продуктивностью свыше 5000 кг молока по наивысшей лактации значение показателя ЧЛМ в опыте двухядерных (бинуклеированных) клеток из 48-часовой культуры лимфоцитов, полученных из периферической крови коров черно-пестрой породы, превышает таковое в контроле. Полученные данные показывают, что интенсивная эксплуатация коров неизбежно приводит либо к нарушению стабильности клеточного генома, либо к изменению механизмов и систем, ответственных за элиминацию аберрантных клеток. Двухядерные (бинуклеированные) клетки из 48-часовой культуры лимфоцитов, полученных из периферической крови коров черно-пестрой породы с добавлением цитохалазина В, имеют микроядра. Количество микроядер в мононуклеарах и бинуклеированных клетках в культуре достоверно отражено при ($P < 0.001$) в лимфоцитах крови коров черно-пестрой породы *in vivo* и *in vitro* с использованием цитохалазина В (с продуктивностью коров свыше 5000 и до 5000 кг молока по наивысшей лактации; ЗАО «Агрофирма Победа» Псковской обл. Последнее указывает на высокую чувствительность метода выявления микроядер с использованием цитокинетического блока. Интересно отметить, что при сравнении частот клеток с микроядрами в лимфоцитах коров наблюдаются достоверные различия между низкой (до 5000 кг) и высокой (выше 5000 кг) продуктивностью молока при высоком уровне значимости ($P < 0.001$). Средняя частота микроядер коров с высокой продуктивностью выше, чем у коров с низкой продуктивностью, что может отражать различия по нестабильности генома крупного рогатого скота.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ ВЕЗИКУЛ, НЕСУЩИХ БЕЛОК СЛИЯНИЯ EEA1, В ХОДЕ ЭНДОЦИТОЗА РЕЦЕПТОРА ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА.
© В. В. Кошеверова,¹ М. В. Злобина,¹ М. В. Харченко,¹ Р. С. Каменцева,² Е. С. Корнилова.^{1,2} ¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, kosheverova_vega@incras.ru, и ² С.-Петербургский государственный университет.

Эндоцитоз (ЭЦ) рецептора эпидермального фактора роста (РЭФР) инициируется при его связывании с рецептором на плазматической мембране (ПМ) клетки. После интернализации ЭФР-рецепторные комплексы выявляются в везикулах, называемых эндосомами. В ходе ЭЦ липидно-белковый состав этих везикул меняется, т. е. они «созревают» из ранних эндосом (РЭ) в поздние (ПЭ). В ходе «созревания» формируются внутренние пузырьки, образующиеся из инвагинаций мембраны эндосомы. Для формирования внутренних пузырьков необходимо увеличить площадь поверхности эндосомы, что обеспечивается благодаря слияниям РЭ друг с другом. Предполагается, что в ходе ЭЦ малая ГТФаза Rab5 рекрутируется на эндо-

сому, привлекая фосфатидилинозитол-3-киназу Vps 34, которая создает на мембране участки, обогащенные фосфатидилинозитол-3-фосфатом (PI3P). Rab5 и PI3P в свою очередь являются сайтами связывания фактора дистанционного взаимодействия EEA1. EEA1 опосредует заякоривание РЭ друг с другом, что необходимо для их последующего слияния. Считается общепринятым, что в клетках в условиях минимальной эндоцитозной активности EEA1 располагается преимущественно в цитоплазме, в то время как стимуляция ЭЦ приводит к его привлечению на поверхность РЭ. Однако мы обнаружили, что в клетках в условиях дефицита ростовых факторов основная часть белка EEA1 присутствует на мембранах везикул, располагающихся в околядерной области, практически не выявляясь в цитозоле. Мы проанализировали распределение, размеры, колокализацию EEA1- и РЭФР-положительных везикул на различных этапах эндоцитоза в клетках линии HeLa Kyoto. Эндоцитоз запускали по схеме импульсной загрузки лиганда. К клеткам добавляли ЭФР при 37 °C на 5 мин, после чего отмывали от несвязавшегося лиганда и переводили в среду без лиганда на определенные промежутки времени (15—90 мин). Поведение EEA1- и РЭФР-положительных везикул исследовали с помощью конфокальной микроскопии как на фиксированных клетках, так и в ходе прижизненных наблюдений. Оказалось, что при стимуляции ЭЦ околядерный пул EEA1-везикул перераспределяется к ПМ клетки. На ранних стадиях (5—15 мин) в периферической части клетки выявляются двухдоменные структуры, состоящие из EEA1-положительной и РЭФР-положительной частей. Прижизненные наблюдения показали, что на начальных этапах ЭЦ EEA1-везикулы в периферической части клетки сливаются с транспортными пузырьками, несущими Су3-меченный ЭФР. На более поздних сроках ЭЦ эндосомы укрупняются и имеют мультидоменную структуру, т. е. содержат в мембране участки, положительные только по EEA1 или по рецептору. При достижении максимальных значений колокализации РЭФР и EEA1-сигналов (30 мин) в клетках наблюдаются агрегаты из нескольких мультидоменных везикул. Прижизненная съемка показала, что эти агрегаты перемещаются в пространстве как единое целое, представляя собой мультидоменные везикулы, заякоренные друг за друга. На поздних сроках (60—90 мин) мультидоменные везикулы отсутствуют, а выявляются отдельные РЭФР и EEA1-положительные везикулы. В ходе прижизненной съемки наблюдается процесс сегрегации EEA1- и ЭФР-положительных доменов эндосомы. Полученные данные свидетельствуют о том, что EEA1-везикулы не формируются в ходе ЭЦ, а предсуществуют в клетке и без его стимуляции. Мы предполагаем, что популяция EEA1-везикул представляет собой особый компартмент, участвующий в обеспечении слияний и успешного прохождения эндоцитоза в клетках.

СТРЕСС-ИНДУКЦИЯ СПОРОФИТНОЙ ПРОГРАММЫ РАЗВИТИЯ ИНИЦИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ АНДРОКЛИННОГО ПОЛИЭМБРИОИДОГЕНЕЗА IN VITRO У ПШЕНИЦЫ. © Н. Н. Круглова, О. А. Сельдимирова. Институт биологии РАН, Уфа, kruglova@anrb.ru

Биологический феномен андроклинии (андрогенез *in vitro*) состоит в стрессиндуцированном переключении программы развития компетентной гаплоидной клетки пыльника с обычного гаметофитного пути на иной

путь — спорофитный, приводящий *in vitro* и *ex vitro* к формированию растения. Один из путей спорофитного развития такой клетки — полиэмбриоидогенез, состоящий в формировании полимерной зародышеподобной структуры — полиэмбриоида — и его развитии до зрелого состояния. Исследование ранних стадий андроклинного полиэмбриоидогенеза *in vitro* привлекает внимание в связи с проблемой индукции смены программы развития клеток. Работа выполнена на примере яровой мягкой пшеницы сорта Жница, который характеризуется высокой частотой образования полиэмбриоидов — более 70 % от количества инокулированных пыльников. Экспериментально выявлено, что инициальными клетками полиэмбриоидов являются микроспоры. До стрессового воздействия микроспоры характеризуются ярко выраженной апикально-базальной полярной организацией — наличием центральной вакуоли и крупного ядра, расположенного строго противоположно поре прорастания. Микроспоры прикреплены к орбикулам оболочек клеток тапетума гнезда пыльника, что обеспечивает их питание и определяет полярность. В целом вся цито-гистологическая организация пыльника как единой системы до стрессового воздействия определяет реализацию морфогенетического потенциала микроспор по гаметофитной программе. Изолированные пыльники подвергали стрессовому воздействию низкими положительными температурами (4 ± 1 °C, 7 сут). Основное стресс-индуцированное событие состоит в отрыве микроспор от орбикул и тем самым — от гнезда пыльника. Такой отрыв приводит к нарушению целостности пыльника как единой системы, нарушению морфогенетических корреляций между тканями стенки пыльника (спорофит) и микроспорами. В микроспорах отмечены структурные деполаризующие изменения: центральная вакуоль фрагментируется за счет формирования цитоплазматических тяжей, соединяющих перинуклеарную и периферическую цитоплазму; ядро перемещается в центр клетки. Оболочки клеток утолщаются, что ведет к изолированию микроспор. Тем самым в «оторвавшихся» микроспорах нарушается детерминация нормального развития гаметофита. Дальнейший цитологический мониторинг показал, что именно в «оторвавшихся» микроспорах на 3—5-е сут культивирования пыльников *in vitro* наблюдаются аномальные симметричные деления, что принципиально отличается от асимметричных делений микроспор в естественных условиях. Симметричные деления связаны с реализацией экспрессии спорофитной программы развития микроспор и ведут к формированию сначала многоядерного ценоцита, а затем многоклеточной структуры — прополиэмбриоида. Таким образом, полученные экспериментальные данные позволяют выделить два взаимосвязанных аспекта стрессовой индукции андроклинного полиэмбриоидогенеза *in vitro* пшеницы — компетентный объект стрессового воздействия (инициальные клетки-микроспоры) и собственно стресс-реакция таких микроспор. Механизмы внутриклеточной «спорофитной сигнализации» микроспор, возможно, как проявление феномена атавизма требуют изучения.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке программы президента РФ (НШ 5282.2014.4).

РОЛЬ WNT7a В РЕГУЛЯЦИИ BMP И NOTCH-СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ ПРИ ПЛАСТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЯХ КЛЕТОК РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО

ЭПИТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА. © А. В. Кузнецова,¹ А. М. Куринов,¹ Е. В. Ченцова,² П. В. Макаров,² М. А. Александрова.¹
¹ Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, avkuzn@list.ru, и ² Научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца, Москва.

Среди подходов к подавлению пластичности клеток ретинального пигментного эпителия (РПЭ) в условиях патологии сетчатки интерес представляет воздействие экзогенными факторами на сигнальные пути, модулирующие дифференцировку клеток. Целью работы явилось изучение влияния лиганда Wnt7a на пролиферативную активность и дифференцировку клеток РПЭ взрослого человека *in vitro*. Клетки РПЭ взрослого человека, полученные из первичного материала, на ранних пассажах культивировали в присутствии человеческого белка Wnt7a (60 нг/мл) и в его отсутствие (контроль). Дифференцировку клеток РПЭ оценивали по изменению экспрессии маркеров РПЭ дифференцировки, адгезивных и цитоскелетных белков, нейральных маркеров, маркеров BMP и Notch-сигнальных путей иммуноцитохимически и количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) через 24, 48 и 72 ч после инкубирования с Wnt7a. Проллиферативную активность клеток РПЭ, обработанных Wnt7a (30 и 60 нг/мл), оценивали через 24 ч в МТТ-тесте. В клетках РПЭ, инкубированных с Wnt7a, выявлялись морфологические различия по сравнению с контрольными клетками. Так, через 24 ч после трипсинизации клеток РПЭ и посадке их на твердый субстрат доля распластанных клеток была выше в группе клеток, обработанных Wnt7a. МТТ-тест показал, что Wnt7a ингибирует пролиферативную активность клеток РПЭ по сравнению с контрольными клетками как при посадке клеток с Wnt7a, так и при внесении данного фактора через 48 ч после установления культуры в дозе 60 нг/мл. Иммуноцитохимически в клетках РПЭ через 24 ч после воздействия Wnt7a по сравнению с контролем наблюдали изменение в локализации и усиление окрашивания на E-кадгерин, β -катенин, BMP2, BMP7 и нейральный маркер Synapsin I и снижение интенсивности окрашивания на BMP4 и нейральные белки MAP1B и TUBB3. Отдельные группы клеток РПЭ окрашивались на Nestin, маркер нейральных стволовых клеток, и маркеры нейронов NF 68—200 кДа. ПЦР-РВ подтвердил результаты иммуноцитохимического окрашивания и показал значимое увеличение экспрессии мРНК BMP2 и BMP7 в клетках РПЭ, инкубированных с Wnt7a. Кроме того, через 24 ч после воздействия Wnt7a в клетках РПЭ отмечено значимое увеличение уровня мРНК Pax6 и MITF. Wnt7a усиливал экспрессию мРНК Jagged1 — лиганда Notch-сигнального пути — почти в 4 раза по сравнению с контролем, но не влиял на уровень экспрессии мРНК целевых генов Notch-сигнального пути HEY1 и HES1. Через 48 ч после воздействия Wnt7a на клетки РПЭ выявлено снижение уровней экспрессии мРНК исследованных генов, и к 72 ч они статистически не отличались от контроля. Кроме того, в клетках РПЭ через 72 ч отмечено нивелирование эффекта Wnt7a на распределение E-кадгерина и β -катенина. Таким образом, экзогенный Wnt7a подавляет пролиферацию клеток, что, вероятно, ускоряет их дифференцировку. Добавление Wnt7a ускоряет развитие находящихся в культуре малодифференцированных нейральных клеток, активируя в них экспрессию белков Synapsin I и NF. Одновременно Wnt7a увеличивает экспрессию транскрипционных факторов Pax6 и MITF, что совместно с усилением окраши-

вания на E-кадгерин может свидетельствовать о возможности редифференцировки клеток РПЭ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-00604).

АКТИНОВЫЙ ЦИТОСКЕЛЕТ В НАТИВНЫХ И ДЕВИТРИФИЦИРОВАННЫХ ООЦИТАХ *BOS TAURUS*. © Т. И. Кузьмина,¹ Т. И. Станиславович,¹ Х. М. Мутиева,² И. Я. Шахтамиров.² ¹Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных, Санкт-Петербург—Пушкин, и ²Чеченский государственный университет, Грозный, prof.kouzmina@mail.ru

Витрификация женских гамет в сочетании с клеточными репродуктивными технологиями — эффективный способ интенсификации внедрения методов клеточной и генетической инженерии в биомедицину и животноводство. Несмотря на несомненные достижения в криобиологии, эффективных методов криоконсервации женских гамет большинства видов животных, кроме человека (М. Kuwayama, 2005), до сих пор не разработано, а результаты исследователей противоречивы. Сохранность сети актиновых филаментов после девитрификации ооцитов — важная составляющая многочисленных факторов, детерминирующих формирование *in vitro* яйцеклетки, компетентной к оплодотворению и развитию из нее эмбрионов. Цель настоящего исследования — сравнить показатели статуса актинового цитоскелета (интенсивности флуоресценции родамин-фаллоидина (ИФРФ), конъюгированного с актиновыми филаментами) в нативных и девитрифицированных (ДВ) ооцитах на разных стадиях мейоза. Актиновый цитоскелет визуализировали окраской родамин-фаллоидином (R415, Invitrogen). Препараты анализировали на конфокальном сканирующем микроскопе. Возбуждение флуоресценции производили светом с длиной волны 546. ИФРФ фиксировали в условных единицах (усл. ед.). Эксперименты по визуализации актинового скелета и измерении интенсивности флуоресценции проводили на базе Центра коллективного пользования «Хромас» (СПбГУ) и Института биологии животных (Думмерсторф, Германия). Хроматин визуализировали Hoechst 33342 (Sigma). Селекцию ооцитов и их культивирование проводили в соответствии с методами, разработанными в Лаборатории биологии развития ФБГНУ ВНИИГРЖ (Кузьмина и др., 2009). Для витрификации ооцит-кумуляные комплексы (ОКК), выделенные из фолликулов диаметром 6—8 мм и затем инкубированные в жидкости фолликулов диаметром ≤ 3 мм, обрабатывали растворами криопротекторов (CRA) на среде ТС-199 с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС; Sigma). CRA-1: 0.7 М диметилсульфоксид (ДМСО) + 0.9 М этиленгликоль (ЭГ); CRA-2: 1.4 М ДМСО + 1.8 М ЭГ; CRA-3: 2.8 М ДМСО + 3.6 М ЭГ + 0.65 М трегалоза. ОКК помещали в CRA-1, затем в CRA-2 на 30 с и в CRA-3 на 20 с. Соломины с ОКК помещали в жидкий азот, через 3 ч извлекали из соломина, помещали в 3 мл 0.25 М трегалозы в ТС-199 с 10 % ФБС при 37 °С, отмывали в 0.19 М и затем 0.125 М трегалозе, окончательно в ТС-199. Проанализированы показатели ИФРФ в нативных и ДВ ооцитах, хроматин которых находился на стадиях диплотены, метафазы-I и метафазы-II. Всего оценено 322 ооцита. Не

обнаружено достоверных различий в уровне ИФРФ в нативных и ДВ ооцитах на идентичных стадиях мейоза. Обнаружены высокие показатели ИФРФ в нативных и ДВ ооцитах на стадии метафазы-I (41.2 ± 6.7 и 43.3 ± 9.8 соответственно), на стадии метафазы-II эти показатели снижались до 25.8 ± 9.3 и 29.7 ± 7.1 ($P \leq 0.05$, Student test), приближаясь к показателям на стадии диплотены (21.1 ± 1.08 и 28.7 ± 1.45). Снижение ИФРФ на стадии метафазы-II можно интерпретировать с учетом блока мейоза на стадии метафазы-II перед овуляцией. Увеличение показателей реорганизации актинового цитоскелета (ИФРФ) на стадии метафазы-I может свидетельствовать об активации интрацеллюлярных процессов, в реализацию которых вовлечены структурные элементы цитоскелета (актиновые филаменты).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-90038 Бел_a).

NAD И ЕГО КЛЮЧЕВЫЕ МЕТАБОЛИТЫ: МЕХАНИЗМЫ ОБРАЗОВАНИЯ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВНУТРИ- И ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПУЛОВ. © В. А. Куликова,¹ К. А. Шабалин,^{1,2} А. П. Якимов,^{1,2} К. Б. Нериновский,^{1,3} М. Цицлер,⁴ А. А. Никифоров.^{1,5} ¹С.-Петербургский политехнический университет Петра Великого, ²Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, ³С.-Петербургский государственный университет, ⁴Университет г. Берген, Норвегия, и ⁵Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, nikiforovan@hotmail.com

Никотинамид аденин динуклеотид (NAD) — важнейший кофактор окислительно-восстановительных реакций ключевых метаболических путей. Помимо этого, NAD является субстратом для нескольких семейств регуляторных белков — деацетилаз белков сиртуинов, АДФ-рибозил трансфераз и поли-АДФ-рибозил полимераз, которые отвечают за деацетилирование, моно- и поли-АДФ-рибозилирование белков. Данные NAD-зависимые посттрансляционные модификации белков регулируют такие жизненно необходимые процессы, как экспрессия генов, правильное прохождение по клеточному циклу, секреция инсулина, репарация ДНК, апоптоз, старение и многие другие. Кроме этого, NAD является предшественником биосинтеза ряда метаболитов (ADPR, cADPR и NAADP), отвечающих за Ca²⁺-зависимый сигналинг. Таким образом, NAD является универсальной внутриклеточной регуляторной молекулой. В отличие от окислительно-восстановительных реакций в реакциях сигналинга NAD постоянно расщепляется, так как все они сопряжены с разрывом N-гликозидной связи между никотинамидом и рибозой. Для эффективного осуществления NAD-зависимых метаболических и сигнальных функций клетке необходимо постоянно поддерживать определенный уровень NAD, а нарушения его регуляции могут быть связаны с развитием таких серьезных патологий, как нейродегенеративные заболевания, диабет и рак. Основным способом поддержания уровня NAD в клетках человека является его биосинтез из поступающих с пищей предшественников, таких как никотинамид (Nam), никотиновая кислота (NA) и рибозиды никотинамида (NR) и никотиновой кислоты (NAR). Несмотря на значительный прогресс в области изучения механизмов биосинтеза NAD, достиг-

нутый за последнее десятилетие, остается ряд нерешенных фундаментальных вопросов, связанных с компартиментализацией NAD-зависимых процессов, а также с механизмами образования и взаимодействия внутри- и внеклеточных пулов NAD и его ключевых метаболитов. В данной работе мы показали, что все известные метаболиты NAD, добавленные во внеклеточную среду, поддерживают синтез внутриклеточного NAD. При помощи ЯМР-спектроскопии мы подтвердили гипотезу о том, что внеклеточные динуклеотиды (NAD и NAAD) и мононуклеотиды (NMN и NAMN) расщепляются до соответствующих нуклеозидов NR и NAR, которые входят в клетки человека посредством описанных переносчиков нуклеозидов. Также мы установили, что помимо поступления с пищей NR и NAR могут образовываться внутри клеток. Было показано, что цитозольные 5'-нуклеотидазы человека CN-II и CN-III дефосфорилируют мононуклеотиды NMN и NAMN с образованием соответствующих нуклеозидов NR и NAR. Более того, мы продемонстрировали, что синтезированный NAR выходит из клеток человека и выступает в роли предшественника для синтеза NAD в других клетках, неспособных метаболизировать Nam и NA.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 14-04-01765 а и 14-04-32117 мол_а).

ХАРАКТЕР И СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ ВЛИЯНИЯ ПРОЛАКТИНА И ГОРМОНА РОСТА НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ МОДИФИКАЦИИ ООЦИТОВ КОРОВ, СТАРЕЮЩИХ IN VITRO. © И. Ю. Лебедева, Г. Н. Сингина, Е. Н. Шедова, А. В. Лопухов. Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства им. акад. Л. К. Эрнста, Подольск—Дубровицы, irlledv@mail.ru

На завершающем этапе созревания *in vivo* и *in vitro* в отсутствие активирующего сигнала в ооцитах млекопитающих инициируются деструктивные процессы, сходные с таковыми, протекающими в яичниках стареющих самок (Miao et al., 2009. Hum. Reprod. Update. 15 : 573—585). Эти процессы обуславливают снижение качества созревших яйцеклеток, что приводит к потере их способности к последующему эмбриональному развитию. Феномен старения ооцитов, достигших метафазы-II, обнаружен у разных видов млекопитающих, в том числе у домашней коровы, и связан с различными цитологическими изменениями, такими как хромосомные аномалии, апоптоз, спонтанная партеногенетическая активация, затвердевание зоны пеллюцида и т. д. (Miao et al., 2009; Лебедева и др., 2014. Цитология. 56 : 57—66). При использовании модели пролонгированного культивирования ооцитов ранее нами было показано тормозящее действие двух родственных гипофизарных гормонов — пролактина (ПРЛ) и гормона роста (ГР) — на скорость модификации метафазных хромосом в стареющих яйцеклетках коров (Lebedeva et al., 2014. Reprod. Fert. Develop. 26 : 196). В настоящей работе было исследовано *in vitro* влияние ПРЛ и ГР на связанные со старением апоптотические изменения созревших ооцитов домашней коровы *Bos taurus taurus* и затвердевание окружающей их зоны пеллюцида. Морфологически нормальные ооцит-кумулусные комплексы (ОКК) культивировали в течение 20 ч в среде ТС-199, содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки, 10 мкг/мл

ФСГ (Sigma) и 10 мкг/мл ЛГ (Sigma). После созревания ооцитов ОКК переносили в среду старения ТС-199 с 10 % сыворотки (контроль) и дополнительно культивировали в течение 24 или 48 ч. В среду опытных групп вносили 50 нг/мл ПРЛ (Эндокринологический научный центр, Москва) или 10 нг/мл ГР (Monsanto, США) и (или) ингибиторы внутриклеточных сигнальных каскадов. Апоптоз в ооцитах выявляли с помощью метода TUNEL (Paula-Lopes et al., 2007. Biol. Reprod. 76 : 532—541), затвердевание зоны пеллюцида оценивали с использованием химотрипсинового теста (Miao et al., 2005. Biol. Reprod. 73 : 1025—1031). Через 24 ч пролонгированного культивирования созревших ооцитов, окруженных клетками кумулюса, было обнаружено резкое возрастание доли яйцеклеток с признаками апоптоза с 8.1 ± 4.7 (0 ч) до 48.6 ± 5.8 % ($P < 0.01$). Внесение ПРЛ в среду старения обуславливало снижение доли таких клеток до 18.0 ± 4.9 % ($P < 0.01$), тогда как ГР не модулировал апоптотические процессы в ооцитах. Ингибитор протеинкиназы С калпостин С (0.9 мкМ) не влиял на апоптоз ооцитов, стареющих в контрольной среде, но подавлял антиапоптотическое действие ПРЛ. Ингибитор Akt-киназы трицирибин (50 мкМ) в целом усиливал апоптотические процессы в ооцитах ($P < 0.001$), однако не блокировал противоположное влияние ПРЛ, который снижал долю яйцеклеток с признаками апоптоза в присутствии трицирибина с 61.8 ± 4.1 до 42.3 ± 7.4 % ($P < 0.05$). Также было установлено, что затвердевание зоны пеллюцида в стареющих яйцеклетках коров происходит медленно и становится заметным только через 48 ч пролонгированного культивирования ($P < 0.05$). При этом ни ПРЛ, ни ГР не влияли на скорость этого процесса. Таким образом, ПРЛ оказывает тормозящее на апоптотические процессы в окруженных кумулюсом ооцитах коров, стареющих *in vitro*, которое реализуется путем активации сигнального пути, ассоциированного с протеинкиназой С. В то же время затвердевание зоны пеллюцида, связанное со старением ооцитов, не зависит от воздействия ПРЛ и ГР.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 13-04-01888 и 15-08-99473).

РЕГУЛЯЦИЯ УРОВНЯ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ ФАКТОРА ЭЛОНГАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ В АНТИГРАВИТАЦИОННОЙ МЫШЦЕ ПРИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКЕ. © Ю. Н. Ломоносова, Б. С. Шенкман. Институт медико-биологических проблем РАН, Москва.

Разгруженные и (или) обездвиженные в течение определенного периода мышцы характеризуются снижением сократительных возможностей, уменьшением белковой массы и размеров мышечных волокон (атрофией). При этом атрофические изменения развиваются в результате снижения как интенсивности синтеза белка, так и интенсификации его распада. В настоящее время недостаточно изучены пусковые механизмы, приводящие к снижению интенсивности синтеза белка, в частности совершенно отсутствуют работы, в которых изучалась бы регуляция процессов элонгации полипептидной цепи в мышце при разгрузке. Показано, что фосфорилирование эукариотического элонгационного фактора 2 (eEF2) его специфической киназой (eEF2k) снижает в 10—100 раз сродство eEF2 к рибосоме, что приводит к снижению ско-

рости синтеза белка (Carlberg et al., 1990). Мы предполагаем, что в условиях гравитационной разгрузки активность eEF2k увеличивается, что может являться одной из причин снижения синтеза белка в мышце при функциональной разгрузке. Было проведено вывешивание крыс по методу Ильина—Новикова в модификации Морей—Холтон в течение 3, 7 и 14 сут. Начиная с 7 сут вывешивания было выявлено уменьшение массы *m. soleus*. Было обнаружено, что уже на 3-и сут разгрузки уровень фосфорилирования eEF2 (T56) был в 5 раз выше такового в контрольной группе. При этом экспрессия мРНК eEF2 оставалась неизменной. Значительный рост экспрессии мРНК, содержания белка eEF2k и уровня фосфорилирования по S366 был обнаружен в *m. soleus* также начиная с 3-х сут вывешивания. Мы предположили, что Ca^{2+}/CaM (кальмодулин)-зависимая eEF2-киназа активируется повышенным уровнем Ca^{2+} , который наблюдается во время разгрузки мышцы. Для проверки этой гипотезы крысам, вывешенным 3 сут, ежедневно вводили ингибитор кальциевых каналов L-типа нифедипин или хелатор катионов кальция ВАРТА-АМ. Введение нифедипина несколько, но достоверно снизило повышение уровня фосфорилирования eEF2 (T56) во время разгрузки, а введение ВАРТА-АМ полностью его предотвратило. Таким образом, уже на ранних сроках вывешивания в *m. soleus* активируется eEF2k, что является кальций-зависимым процессом, в котором отчасти участвуют кальциевые каналы L-типа. Значительное повышение уровня фосфорилирования eEF2 (T56) может являться одной из основных причин снижения синтеза белка во время функциональной разгрузки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 11-04-01769-а, 15-04-05729-а).

МЕХАНИЗМ МОДУЛЯТОРНОГО ВЛИЯНИЯ ГАММА-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ НА ПРОЦЕССЫ ВЫДЕЛЕНИЯ АЦЕТИЛХОЛИНА В НЕРВНО-МЫШЕЧНОМ СИНАПСЕ КРЫСЫ. © А. И. Маломуж,¹⁻³ К. А. Петров,¹⁻³ Е. Е. Никольский.¹⁻⁴ ¹ Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, artur57@list.ru, ² Казанский (Приволжский) федеральный университет, ³ Институт органической и физической химии им. А. Е. Арбузова, Казань, и ⁴ Казанский государственный медицинский университет.

Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) представляет собой один из основных тормозных медиаторов в центральной нервной системе и играет ключевую роль в развитии, созревании и функционировании мозга, модулируя нейрональную активность посредством активации ионотропных ГАМК_A- и метаботропных ГАМК_B-рецепторов (Bowery et al., 2002; Olsen, Sieghart, 2008). К настоящему моменту получен ряд свидетельств в пользу того, что эта аминокислота способна играть определенную синаптическую роль и за пределами ЦНС, в частности в симпатических ганглиях, где было продемонстрировано угнетающее влияние ГАМК на процессы выделения ацетилхолина (АХ) (Kato, Kuba, 1980). При этом однозначного ответа на вопрос относительно влияния аминокислоты и наличия специфических функциональных ГАМК-рецепторов в другом периферическом холинергическом синапсе, а именно в нервно-мышечном контакте,

до сих пор получено не было, что и предопределило проведение настоящего исследования. Целью работы стало изучение влияния ГАМК на все три известных к настоящему моменту процесса выделения АХ — неквантовое, спонтанное квантовое и вызванное квантовое освобождение.

Эксперименты проводили на нервно-мышечном препарате диафрагмы белых лабораторных крыс с использованием стандартных методов электрофизиологии и с применением современных фармакологических агентов. Так, нами было показано, что аппликация ГАМК не влияет на интенсивность процесса спонтанной квантовой секреции АХ, оцениваемой по средней частоте миниатюрных потенциалов концевой пластинки, однако значительно снижает интенсивность неквантового выделения АХ, детектируемого по величине Н-эффекта (степень гиперполяризации постсинаптической мембраны после блокады холинорецепторов в условиях ингибированной ацетилхолинэстеразы (Vyskocil et al., 2009)). Интенсивность вызванной квантовой секреции медиатора, оцениваемой по величине квантового состава потенциалов концевой пластинки, также значительно снижалась. Ингибирующее влияние аминокислоты на процессы неквантового и вызванного квантового выделения АХ оставалось без изменений на фоне блокатора ГАМК_A-рецепторов пикротоксина, но полностью отсутствовало после предварительной аппликации блокатора ГАМК_B-рецепторов CGP 55845. Ингибирование фосфолипазы С соединением U73122 также полностью предотвращало снижение интенсивности неквантового и вызванного квантового выделения АХ под действием ГАМК.

Таким образом, полученные нами данные позволяют сделать предположение о том, что в нервно-мышечном синапсе млекопитающего локализованы метаботропные ГАМК_B-рецепторы, активация которых приводит к опосредованному фосфолипазой С снижению интенсивности как неквантового, так и вызванного квантового выделения АХ. А это в свою очередь предполагает возможность того, что ГАМК, рассматриваемая до недавнего времени исключительно в аспекте функционирования ЦНС, способна играть модуляторную роль и в нервно-мышечном контакте.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 14-04-01788 и 13-00-40286-К) и президента РФ (НШ-5584.2014.4).

РНК И РНК-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ В ФОРМИРОВАНИИ ЦИТОСКЕЛЕТА. © Л. А. Мамон, А. А. Ацапкина, А. О. Якимова, Е. В. Голубкова. Кафедра генетики и биотехнологии С.-Петербургского государственного университета, mamon@lm2010.spb.edu

Цитоскелет определяет морфологию клетки, обеспечивает их подвижность и миграцию, является основой внутриклеточной и межклеточной коммуникации. Способность цитоскелета к самосборке, росту и размножению позволяет высказывать предположение о том, что макромолекулярные структуры, аналогичные цитоскелету, являются примитивными формами зарождения жизни. Связь цитоскелета с РНК и аппаратом трансляции создает предпосылки для биосинтеза цитоскелетных белков непосредственно в районе роста: в лидирующей кромке

фибробластов, в кончике отростка нервной клетки и в зоне роста аксонемы сперматозоида. мРНК *β-actin* одной из первых была отнесена к классу так называемых локализованных мРНК. Ее трансляция осуществляется в районе сборки актиновых филаментов. Полагают, что в формировании микротубулинового цитоскелета аналогичную роль выполняют тубулиновые мРНК. Существование особых МТ-РНК, связанных с аппаратом деления клетки, является весомым аргументом в пользу значения РНК в динамичных преобразованиях цитоскелета (Sharp et al., 2011). Трансляция локализованных мРНК строго регулируется, обеспечивая появление соответствующего белка в нужном месте и в нужное время, а нарушение этого процесса, как правило, имеет доминантно-негативный эффект.

Судьба долгоживущих мРНК определяется еще в ядре благодаря формированию комплексов мРНК, способных сохранять мРНК в состоянии, временно недоступном для трансляции, а благодаря присутствию в комплексе моторных белков — обеспечивать доставку мРНК в соответствующее место в клетке. Семейство белков NXF (Nuclear Export Factor) у высших эукариот включает в себя основной наиболее эволюционно-древний белок NXF1, осуществляющий неспецифический экспорт большинства различных мРНК из ядра в цитоплазму. К этому семейству принадлежат и белки-паралоги, выполняющие специализированные функции и участвующие в метаболизме долгоживущих мРНК в цитоплазме. У *Drosophila melanogaster* специализация NXF1 происходит за счет образования органоспецифичных продуктов гена *Dm nxf1 (sbr)* — как транскриптов, так и белков. Показанная нами случайная локализация белка *Dm NXF1* в цитоплазме синцитиальных эмбрионов и сперматогенных клеток, а также его присутствие в составе гранул в отростках нервных клеток согласуются с теми нарушениями, которые описаны у мутантов по гену *sbr*, кодирующему белок *Dm NXF1*. Среди них: «митотические катастрофы» в ранних эмбрионах, образование аномальных, в том числе и трехполюсных, веретен в мейозе у самок, специфические дефекты структуры мозга и соответствующие отклонения в поведении, характерные аномалии аксонемы и отсутствие подвижных сперматозоидов. Большинство перечисленных особенностей мутантного фенотипа имеет доминантный аллелеспецифичный характер. Это позволяет связывать функции NXF1 с формированием и функционированием цитоскелета. В пользу такой точки зрения свидетельствуют и результаты, известные из литературы: непосредственное взаимодействие *Mm NXF1* мыши с MAP1 (microtubule associated protein 1) (Tretyakova et al., 2005), нарушение способности отростков нервных клеток достигать мишеней у мутантов по гену *sbr*, объясняемое дефектами актинового цитоскелета (Korey et al., 2001).

ИССЛЕДОВАНИЕ УЧАСТИЯ НУКЛЕОСТЕМИНА И FGF2 В РЕАЛИЗАЦИИ МИТОГЕННЫХ СИГНАЛОВ ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ СЕТЧАТКИ У ТРИТОНА.
© Ю. В. Маркитантова, П. П. Авдонин, Э. Н. Григорян.
Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, yuliya.mark@gmail.com

Восстановление всех типов нейронов и глии при регенерации сетчатки у тритона осуществляется в результате репрограммирования клеток ретинального пигментного эпителия (РПЭ) и формирования ими популяции ак-

тивно пролиферирующих мультипотентных нейробластов (Chiba, Mithashov, 2007). Эти процессы — уникальный пример тканевой регенерации *in vivo* они находятся под контролем перекрывающихся генных сетей. Важной составляющей в регуляторных механизмах являются белки ядрышка и сигнальный путь, опосредуемый FGF2 (Bartova et al., 2010; Stocum, 2012). Для исследования механизмов конверсии клеточного типа при делении клеток РПЭ тритона особый интерес представляет изучение консервативного GTP-связывающего белка ядрышка нуклеостемина (NS/Ns и GNL3/Gnl3), который вовлечен в передачу митогенных сигналов (Tsai, McKay, 2005). В тканях глаза взрослого тритона *Pleurodeles waltl* ранее мы идентифицировали ген *fgf2*, кодирующий фактор роста фибробластов Fgf2, и ген *NS*, кодирующий GTP-связывающий белок ядрышка нуклеостемина. Была дана структурная характеристика идентифицированных нуклеотидных последовательностей изучаемых генов (Маркитантова и др., 2014, 2015). В настоящей работе проведен сравнительный анализ экспрессии и локализации фактора роста фибробластов Fgf2, рецепторов Fgfr и белка ядрышка нуклеостемина Ns с использованием методов ПЦР, ПЦР реального времени и иммунохимии. Полученные результаты свидетельствуют о возрастании уровня экспрессии генов *Fgf2* и *Ns* (по сравнению с нативной сетчаткой) на стадии наиболее активной пролиферации возникающих из РПЭ нейробластов регенерирующей сетчатки. Интересно, что в других модельных системах транскрипционная активность нуклеостемина также усиливается в пролиферирующих нейральных, эмбриональных стволовых и некоторых линиях раковых клеток, где он принимает участие в контроле репликации ДНК и деления клеток (Sijin et al., 2004; Amini et al., 2014). В мезенхимных стволовых клетках человека в системе *in vitro* наблюдается дозозависимое возрастание уровня экспрессии нуклеостемина на фоне усиления пролиферативной активности этих клеток под влиянием сигналов FGF2 (Kafienah et al., 2006). Помимо у-регуляции экспрессии генов *fgf2* и *Ns* мы обнаружили солокализацию белков Fgf2 и Ns, а также рецепторов Fgfr как в нативной сетчатке, так и в нейробластах раннего регенерата сетчатки тритона с помощью флуоресцентной и нефлуоресцентной иммунохимии. Интересно, что фактор роста фибробластов Fgf2 был выявлен не только в цитоплазме клеток, но также в ядре. Сходство транскрипционной активности, пространственного распределения белков Fgf2, Ns и Fgfr в клетках нативной сетчатки и регенерата позволяет предполагать взаимодействие и участие этих молекулярных компонентов в общем сигналинге, работающем в процессе репрограммирования и пролиферации клеток РПЭ. С другой стороны, локализация Fgf2 (как и некоторых изоформ) в ядрах клеток сетчатки может указывать на возможность осуществления биологических функций не только посредством связывания с рецепторами, но также в качестве кофактора, регулирующего активность генов. Таким образом, в нативной сетчатке и нейробластах регенерирующей сетчатки тритона выявлена корреляция между экспрессией сигнального белка Fgf2, Ns и Fgfr. Предполагается участие нуклеостемина в реализации митогенных сигналов Fgf2 в механизмах регуляции пролиферации нейробластов при регенерации сетчатки взрослого тритона, что требует дальнейшего изучения.

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

ект 14-04-00184) и программы «Живая природа: современное состояние и проблемы развития».

КАК ВИМЕНТИН ПОМОГАЕТ ВЫЖИТЬ РАКОВЫМ КЛЕТКАМ. © Е. А. Матвеева, Л. С. Венкова, В. С. Влащенко, А. А. Мишин. Институт белка РАН, Москва, alexminin@gmail.com

Промежуточные филаменты (ПФ) являются одним из компонентов цитоскелета в животных клетках, функции которого наименее изучены. На разных этапах эмбрионального развития, на разных стадиях дифференцировки и в разных типах клеток экспрессируются ПФ, состоящие из разных белков. Всего в геноме человека обнаружено около 70 генов, кодирующих различные белки ПФ, которые образуют одно из самых многочисленных белковых семейств. Виментин, один из них, характерен для фибробластов, лейкоцитов, клеток эндотелия и некоторых других мезенхимных клеток. Кроме того, виментин обнаруживается в клетках, для которых характерны ПФ, состоящие из других белков. Так, при эпителиально-мезенхимном переходе (ЭМП) в клетках эпителия с кератиновыми ПФ появляется виментин. Интересно, что образуемые в результате ЭМП клетки приобретают не только способность к миграции, но и повышенную устойчивость к различным противораковым препаратам. Поскольку такие превращения клеток наблюдаются при злокачественной трансформации многих опухолей, выяснение их причин имеет большое практическое значение. Ранее мы показали, что виментиновые ПФ взаимодействуют с митохондриями и влияют на их внутриклеточную подвижность и трансмембранный потенциал. Мы предположили, что увеличение устойчивости клеток к цитостатикам при экспрессии виментина может быть связано с его способностью взаимодействовать с митохондриями и влиять на их свойства. Чтобы проверить эту гипотезу, мы использовали клетки MFT-16, лишенные ПФ, для получения линий с восстановленными виментиновыми ПФ при помощи ретровирусной трансфекции. В этих линиях ПФ состояли из виментина дикого типа, способного связываться с митохондриями, или из мутантных форм, которые такую способность утратили. Анализ жизнеспособности клеток в присутствии различных концентраций двух наиболее часто используемых препаратов — винкристина и адрибластина — показал, что виментин оказывает на клетки защитный эффект только в том случае, если он может взаимодействовать с митохондриями.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 13-04-00931а и 12-04-32280м).

МЕТОД АСМ — НОВЫЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ СТРУКТУРНОЙ САМООРГАНИЗАЦИИ КОМПЛЕКСОВ NI И FE, МОДЕЛИРУЮЩИХ ДЕЙСТВИЕ АЦИРЕДУКТОН-ДИОКСИГЕНАЗ (Ni(Fe)-ARD). ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ Ni-ARD ПРИ РЕГУЛИРОВАНИИ ОБРАЗОВАНИЯ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРОВ. © Л. И. Матиенко, В. И. Бинюков, Л. А. Мосолова, Е. М. Миль, Г. Е. Заиков. Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва, matienko@sky.chph.ras.ru

В течение миллиардов лет природа искусно создавала суперсложные надмолекулярные структуры через процессы биораспознавания и биомолекулярной организации, используя различные нековалентные взаимодействия. Недавно открытые две ациредуктон-диоксигеназы Ni-ARD и Fe-ARD примечательны тем, что, являясь членами структурного суперсемейства купинов, представляют собой необычный случай катализа, поскольку различаются механизмом действия по отношению к общим субстратам (1,2-дигидрокси-3-оксо-5(метилтио)пент-1-ен(ациредуктон) и кислород) и превращают ациредуктон в различные продукты. Ni^{II}(Fe^{II})-ARD обладают одним и тем же полипептидным окружением, но при этом различаются ионом металла (Ni²⁺ и Fe²⁺) и структурой. Метионин образуется в результате окисгенирования ациредуктона молекулярным кислородом, катализируемого ферментом Fe^{II}-ARD. В результате деятельности Ni^{II}-ARD метионин не образуется. Однако установлена важная функция никелевого фермента: в результате действия Ni^{II}-ARD образуется оксид углерода (CO), который, подобно оксиду азота (NO), является представителем нового класса нейротрансмиттеров. Мы предположили, что различная самоорганизация катализатора в макроструктуры за счет межмолекулярных H-связей и других нековалентных взаимодействий может быть одной из причин такого необычного функционирования Ni^{II}(Fe^{II})-ARD-ферментов. Мы предлагаем новый подход (АСМ) для исследования самоорганизации комплексов никеля и железа, являющихся моделями Ni^{II}(Fe^{II})-ARD, в макроструктуры различной формы за счет межмолекулярных H-связей (Matienko et al., 2012. J. Biol. Res. 1 : 37). Генерируемые на модифицированной кремниевой поверхности за счет H-связей структуры на основе Ni^{II}₂(AcO)₃(acac)MP · 2H₂O (MP=N-метилпирролидон-2) («А») (Ni^{II}-ARD) имеют форму трех почти слившихся сфер около 20—35 нм по высоте. Макроструктуры на основе комплексов Fe^{III}_x(acac)_y18C6_m(H₂O)_n («В») (Fe-ARD) напоминают форму микроволокнистой трубочки тубулина с высотой около 3—4 нм, в разрезе (при фиксированной длине и ориентации) — 40—60 нм. Структурная организация комплексов железа («В») может способствовать активации O₂ (Fe^{II} + O₂ → Fe^{III} - O₂⁻), первой стадии в механизме Fe^{II}-ARD, последующему региоселективному присоединению активированного кислорода к ациредуктону и реакциям, приводящим к метионину. Преобразование мономерных форм в многомерные (в случае Ni^{II}-ARD) («А») может быть одним из способов регулирования Ni^{II}(Fe^{II})-ARD активности. Мы предполагаем, что необходимо принимать во внимание также роль Туг — фрагмента во второй координационной сфере центрального иона металла. Как было нами установлено, включение PhOH в координационную сферу комплекса Ni(acac)₂ · MP, являющегося моделью первичных комплексов в случае Ni^{II}-ARD, приводит к его стабилизации, лиганд асac (аналог β-дикетонатного лиганда ациредуктона) не подвергается O₂-зависимой трансформации. Образование супрамолекулярных макроструктур за счет межмолекулярных H-связей на основе комплексов Ni(acac)₂ · L² · PhOH, установленное нами методом АСМ, свидетельствует в пользу стабилизирующей роли фенольного лиганда.

ВЛИЯНИЕ МЕСТНЫХ АНЕСТЕТИКОВ НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ ЛИПИДНЫХ БИСЛОЕВ ДЛЯ КАЛЬЦЕИ-

НА. © Р. Я. Медведев,^{1,2} С. С. Ефимова,¹ О. С. Остроумова.¹ ¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и ² Институт физики нанотехнологий и телекоммуникаций С.-Петербургского политехнического университета Петра Великого, 4ragon@rambler.ru

Местное обезболивание принято связывать с эффектом анестезирующих агентов на потенциалзависимые натриевые каналы. В литературе обсуждается вопрос о модулировании функции задействованных в развитии анестезии ионных каналов путем изменения физических свойств липидного бислоя при адсорбции анестетиков (Sonner, Cantor, 2013. Ann. Rev. Biophys.). Установлено, что адсорбция молекул анестетиков на липидной мембране приводит к изменению ее дипольного потенциала (Hogberg, Lyubartsev, 2008. Biophys. J.), температуры плавления мембранообразующих липидов (Hata et al., 2000. Biophys. Chem.) и проницаемости липидного бислоя для малых органических молекул, таких как карбоксифлуоресцин (Onyuksel et al., 2007. Chemico-Biological Int.). Стоит отметить, что в большинстве цитируемых работ систематических исследований влияния различных локальных анестетиков на физико-химические свойства липидных мембран не проводилось. В работе исследовано влияние местных анестетиков на текучесть фосфолипидных мембран. Протестированы амиды, гидрохлориды лидокаина, прилокаина, мепивакаина и бупивакаина, а также сложные эфиры, бензокаин, гидрохлориды прокаина и тетракаина. О проницаемости липидных бислоев судили по интенсивности флуоресценции кальцеина, высвобожденного из диолеилфосфатидилхолиновых (ДОФХ) моноламелярных липосом. Анестетики добавляли к суспензии липосом до концентрации от 0 до 100 мМ. Результаты измерений показали: 1) в исследуемом диапазоне концентраций бензокаин и прокаин проницаемости ДОФХ-мембран для кальцеина не изменяют; 2) пороговая концентрация тетракаина, вызывающая увеличение высвобождения кальцеина, составляет 2 мМ, при концентрации 50 мМ происходит полная дезинтеграция липосомальных мембран; 3) амидные анестетики слабо влияют на выход красителя из липосом (10 % при 10 мМ). Обнаруженная разница во влиянии местных анестетиков на текучесть ДОФХ липосом может быть обусловлена особенностями химических структур модификаторов, в частности разным числом и расположением полярных аминогрупп, а также наличием дополнительных гидрофобных радикалов. Указанные факторы могут определять глубину погружения и ориентацию анестетиков в липидном бислое.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-34-20356) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

ВИСКОСТАТИН МОДУЛИРУЕТ ВЛИЯНИЕ ГЛУТОКСИМА НА ТРАНСПОРТ Na^+ В КОЖЕ ЛЯГУШКИ.
© А. В. Мельнищкая, З. И. Крутецкая, С. Н. Бутов, Н. И. Крутецкая, В. Г. Антонов. Биологический факультет С.-Петербургского государственного университета, avm242@hotmail.ru

Кожа амфибий и другие изолированные эпителиальные системы являются классическими модельными объ-

ектами для исследования механизмов транспорта ионов через биомембраны. Ранее нами было показано, что транспорт Na^+ в коже лягушки модулируется различными окисляющими агентами, такими как цистамин, цистин, окисленный глутатион (GSSG) и его синтетический аналог препарат глутоксим® (ФАРМА-ВАМ, Санкт-Петербург). Впервые обнаружено, что GSSG и глутоксим, приложенные к базолатеральной поверхности кожи лягушки, имитируют действие инсулина и стимулируют транспорт Na^+ . Показано также, что в регуляции глутоксимом транспорта Na^+ в коже лягушки принимают участие тирозинкиназы и фосфатидилинозитолкиназы, протеинкиназа С, серин/треониновые протеинфосфатазы PP1/PP2, микротрубочки и микрофиламенты, каскад метаболизма арахидоновой кислоты и процессы везикулярного транспорта. Известно, что активный цитоскелет участвует в регуляции трансэпителиального транспорта Na^+ и активности многих Na^+ -транспортирующих белков, локализованных с актиновыми филаментами и актинсвязывающими белками. Ключевую роль в процессах формирования устойчивых филаментов из мономеров G-актина играет комплекс Arp2/3 (Actin-Related Proteins). В состав сайтов нуклеации входят также WASP-белки (Wiskott—Aldrich syndrome family proteins, семейство белков синдрома Вискотта—Олдрича), которые активируют Arp2/3-комплексы, обеспечивают их взаимодействие с мономерами актина, запускают полимеризацию актина и формирование разветвленных актиновых филаментов. В связи с этим представлялось интересным исследовать возможное участие процессов роста и ветвления актиновых филаментов во влиянии глутоксима на транспорт Na^+ в коже лягушки. В экспериментах использовали ингибитор белка N-WASP вискостатин. Для регистрации вольт-амперных характеристик (ВАХ) кожи лягушки использовали автоматизированную установку фиксации потенциала. В интервалах между измерениями ВАХ трансэпителиальный потенциал (V_T) кожи поддерживали при потенциале открытой цепи V_{OC} ($V_{OC} = V_T$ при трансэпителиальном токе $I_T = 0$). Из ВАХ определяли электрические параметры кожи: ток короткого замыкания I_{SC} ($I_{SC} = I_T$ при $V_T = 0$), V_{OC} и трансэпителиальную проводимость g_T . Транспорт Na^+ оценивали как амilorид-чувствительный I_{SC} . Статистический анализ проводили с применением *t*-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде $x \pm s_x$. Показано, что глутоксим, приложенный к базолатеральной поверхности интактной кожи лягушки, стимулирует транспорт Na^+ . В среднем (по результатам 10 экспериментов) после приложения 100 мкг/мл глутоксима I_{SC} возрастает на $31.24 \pm 8.32\%$; V_{OC} — на $38.04 \pm 5.15\%$; g_T не меняется. Показано, что вискостатин существенно снижает стимулирующее влияние глутоксима на транспорт Na^+ . В среднем (по данным 10 экспериментов) изменение электрических характеристик кожи лягушки после добавления 100 мкг/мл глутоксима к базолатеральной поверхности кожи, предварительно обработанной в течение 30 мин со стороны апикальной поверхности 10 мкМ вискостатина, было следующим: I_{SC} увеличивается на $14.34 \pm 3.12\%$, V_{OC} — на 16.09 ± 5.11 , а g_T — на $1.58 \pm 0.32\%$. Таким образом, нами впервые показано, что ингибитор WASP-белков вискостатин модулирует влияние глутоксима на транспорт Na^+ . Полученные данные свидетельствуют об участии WASP-белков и важной роли процессов сборки актиновых филаментов во влиянии глутоксима на транспорт Na^+ в коже лягушки.

УЧАСТИЕ ФОСФОЛИПАЗЫ A_2 ВО ВЛИЯНИИ ГЛУТОКСИМА НА ВНУТРИКЛЕТОЧНУЮ КОНЦЕНТРАЦИЮ Ca^{2+} В МАКРОФАГАХ. © Л. С. Миленина, З. И. Крутецкая, А. А. Наумова, С. Н. Бутов, Н. И. Крутецкая, В. Г. Антонов. Биологический факультет С.-Петербургского государственного университета.

Синтетический аналог окисленного глутатиона (GSSG) препарат глутоксим® (динатриевая соль GSSG с d-металлом в наноконцентрации, ФАРМА-ВАН, Санкт-Петербург) относится к группе лекарственных средств тиопозитинов, влияющих на процессы редокс-регуляции в клетках; используется как иммуномодулятор и гемостимулятор в комплексной терапии бактериальных и вирусных заболеваний, псориаза, лучевой и химиотерапии в онкологии. Однако клеточные и молекулярные механизмы его действия далеки от полного понимания. Ранее нами впервые обнаружено, что глутоксим увеличивает внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} [Ca^{2+}]_i, вызывая мобилизацию Ca^{2+} из тансигаргин-чувствительных Ca^{2+} -депо и последующий депозависимый вход Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги крысы. Кроме того, ранее нами показано, что в комплексном сигнальном каскаде, запускаемом глутоксимом в макрофагах и приводящем к увеличению [Ca^{2+}]_i, участвуют ферменты и (или) продукты циклооксигеназного и липоксигеназного путей окисления арахидоновой кислоты (АК). Поскольку запуск каскада метаболизма АК — одно из ключевых событий в активации макрофагов, представлялось также целесообразным исследовать участие ключевого («стартового») фермента каскада — фосфолипазы A_2 (ФЛА₂) — во влиянии препарата глутоксим на [Ca^{2+}]_i в перитонеальных макрофагах крысы. Объектом исследования служили культивируемые резидентные перитонеальные макрофаги крысы. Для измерения [Ca^{2+}]_i использовали флуоресцентный Ca^{2+} -зонд Fura-2AM. Эксперименты проводили на 1—2-е сут после начала культивирования клеток на автоматизированной установке для измерения [Ca^{2+}]_i на базе флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B (Leica Microsystems, Германия). Для выявления возможного участия ФЛА₂ во влиянии глутоксима на [Ca^{2+}]_i в макрофагах был использован ингибитор ФЛА₂ 4-бромфенацилбромид (2,4'-дибромоацетофенон). В контрольных экспериментах показано, что 200 мкг/мл глутоксима вызывают двухфазный Ca^{2+} -ответ, связанный с мобилизацией Ca^{2+} из внутриклеточных депо и последующим депозависимым входом Ca^{2+} в макрофаги. Впервые показано, что предварительная инкубация макрофагов с 20 мкМ 4-бромфенацилбромида в течение 15 мин до введения 200 мкг/мл глутоксима приводит к существенному подавлению как фазы мобилизации Ca^{2+} (в среднем на 47.1 %), так и последующего входа Ca^{2+} (в среднем на 79.4 %), вызываемых глутоксимом, по сравнению с контролем. Полученные данные свидетельствуют об участии ФЛА₂ и каскада метаболизма АК во влиянии глутоксима на [Ca^{2+}]_i в макрофагах. Кроме того, результаты, полученные в этой работе и ранее, свидетельствуют о том, что препарат глутоксим, неспособный проникать через плазмалемму, вызывает в макрофагах комплексный сигнальный каскад, приводящий к увеличению [Ca^{2+}]_i и активации макрофагов, одним из ключевых событий в котором является запуск каскада метаболизма АК и продукции биологически активных продуктов эйкозаноидов.

СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКОВ ПУТИ АПОПТОЗА В КРОВИ КУРЯЩИХ МУЖЧИН И ПРИ РМЖ У ЖЕНЩИН. © Е. М. Миль, А. А. Албантова, А. И. Козаченко, Л. Г. Наглер, Д. Б. Корман, Е. Б. Бурлакова. Институт биохимической физики РАН им. Н. М. Эмануэля, Москва, elenamil2004@mail.ru

Известно, что содержание белка-регулятора апоптоза p53 в крови онкологических больных увеличивается, поэтому длительное время ген P53 считался онкогеном. Однако оказалось, что в норме белок играет ключевую роль в сигнальном p53-зависимом пути репарации и апоптоза и в регуляции иммунного ответа. Было изучено содержание p53 в крови курильщиков, а также в крови пациентов, больных раком молочной железы (РМЖ), до и после лечения (Миль и др., 2005, 2012) Ранее в ряде работ было показано, что курильщики находятся в зоне наибольшего риска по частоте возникновения рака легких и дыхательных путей, поскольку под действием сигаретного дыма происходит постоянный апоптоз клеток гортани, что приводит к замещению в гене p53, появлению долгоживущего белка и изменениям в регуляции апоптоза. Нами обнаружено, что у онкологических больных курильщиков (рак верхних дыхательных путей) содержание белка p53 в сыворотке крови существенно выше и более чем в 3 раза ($P = 0.0002$) превышает уровень p53 в группе здоровых. Отмечалась высокая вариабельность параметра p53 в контрольной группе (0.8—3.2 отн. ед.), не коррелировавшая с интенсивностью курения. При этом уровень антиапоптозного белка bcl-2 у онкологических больных и здоровых доноров (некурящих и слабо курящих) не различался. Но у сильно курящих здоровых доноров — при постоянном апоптозе клеток гортани — уровень bcl-2, участвующего в противовоспалительном и антиоксидантном процессах, резко возрастал. Также отмечалось усиление активности антиоксидантной системы (ферментов СОД, ГП), что, вероятно, защищало их от развития онкологического процесса и могло быть связано с особенностями генотипа. При изучении содержания p53 у всех 10 больных РМЖ III—IV степени был зарегистрирован высокий уровень p53. Лечение двумя курсами химиотерапии с доксорубицином способствовало торможению опухолевого процесса за счет апоптоза клеток опухоли. У пациентов среднего возраста (36—54 года) сразу после химиотерапии в сыворотке крови отмечался рост содержания p53 (на 16—22 %), при этом индукция гена p53 дикого типа может приводить как к апоптозу, так и к репарации клеток. В пользу процессов репарации свидетельствовали изменение содержания основных иммуноглобулинов, снижение IgA и возрастание IgM и IgG, что позволяет лимфоцитам избежать апоптоза (вторичный иммунный ответ). У пациенток пожилого возраста (61—70 лет) отмечены уменьшение содержания белка p53 (17—25 %) и значительное ухудшение самочувствия. При этом у всех больных этой группы наблюдались возрастание IgM и снижение IgG и IgA (подобно первичному иммунному ответу). По-видимому, малая эффективность лечения являлась следствием возрастного снижения иммунитета и отражала дисфункцию регуляторных отношений в системах иммунной защиты и апоптоза. Лечение пожилых пациентов, по-видимому, следует сопровождать применением иммуностимуляторов и антиоксидантов. Примером препарата, вызывающего положительный антиапоптозный эффект, может служить антиоксидант фенозан, который ранее показал хороший противоопухоле-

вый эффект и, как было показано нами, вызывал индукцию p53 и белка Bcl-2 в крови мышей линии АКЭ и селезенке мышей низкоразовой линии F1.

Список литературы

Миль Е. М., Гуревич С. М., Козаченко А. И., Наглер Л. Г., Албантова А. А., Фаткуллина Л. Д., Бурлакова Е. Б. 2012. Влияние курения и опухолевого процесса на содержание ключевых белков апоптоза и активность антиоксидантных ферментов крови. Изв. РАН. Сер. биол. 1 : 19—26.

Миль Е. М., Мышлякова О. В., Микаэлян С. Г. 2005. Содержание белка p53 и иммуноглобулинов после комбинированной химиотерапии больных раком молочной железы в зависимости от возраста. Клинич. геронтол. 3 : 15—20.

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, РЕГУЛИРУЮЩИЕ СИНТЕЗ БЕЛКА В СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ КРЫСЫ В ПЕРИОД РЕАДАПТАЦИИ ПОСЛЕ МОДЕЛИРУЕМОЙ МИКРОГРАВИТАЦИИ. © Т. М. Мирзоев, С. А. Тыганов, Б. С. Шенкман. Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, tmirzoev@yandex.ru

Восстановление мышечной массы после дисфункциональной атрофии скелетных мышц является актуальной проблемой для космической биологии и реабилитационной медицины. Однако молекулярные механизмы, регулирующие синтез белка в период реадaptации после функциональной разгрузки, являются малоизученными. Поэтому цель настоящего исследования состояла в анализе анаболических сигнальных путей в скелетной мышце крысы в период восстановления после гравитационной разгрузки. С помощью ингибиторного анализа был проанализирован вклад таких сигнальных путей, как PI3K-Akt-mTORC1 и PLD-PA-mTORC1, а также стретч-чувствительных кальциевых каналов в регуляцию белкового синтеза в камбаловидной мышце крысы. Антиортогостатическое вывешивание задних конечностей крыс Вистар с целью моделирования гравитационной разгрузки проводили по стандартной методике Ильина—Новикова в модификации Morey—Holton. Интенсивность синтеза белка в *m. soleus* оценивали методом SUnSET. Программа эксперимента и все манипуляции, выполняемые с животными, были одобрены комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ — ИМБП РАН. После 14-суточной гравитационной разгрузки интенсивность синтеза белка в камбаловидной мышце крысы снизилась на 33 % ($P < 0.05$). Однако после периода реадaptации в течение 3 сут произошел рост синтеза белка на 40 % ($P < 0.05$) относительно группы «14-HS». У животных, которым на фоне восстановления вводили ингибиторы вортманнин и бутанол-1, произошло снижение интенсивности синтеза белка относительно «14HS+3R+плацебо» на 35.6 и 38.5 % ($P < 0.05$) соответственно. После 14-суточной гравитационной разгрузки содержание фосфорилированной рибосомальной киназы p-r70 достоверно не отличалось от контроля. Период 3-суточной реадaptации привел к достоверному увеличению содержания данной киназы в *m. soleus* относительно группы «14-HS». При введении ингибитора бутанола-1 наблюдалось снижение p-r70 на 57.7 % ($P < 0.05$) относительно группы «чистого» восстановления. Содержание фосфорилированной рибосомальной киназы p-90 RSK достоверно снизилось в группе «3R+плацебо» на 84.5 % ($P < 0.05$) относительно группы «контроль».

При применении соли гадолиния изменения фосфорилирования p70S6K не обнаружено, однако наблюдалось увеличение фосфорилированной формы 4E-BP1. При воздействии соли гадолиния мы обнаружили достоверное повышение интенсивности синтеза белка в 1.5 раза по сравнению с группой реадaptации на фоне плацебо ($P < 0.05$). В связи с неоднородной реакцией анаболических маркеров на введение соли гадолиния можно предположить, что увеличение синтеза белка в данном случае могло быть связано с компенсаторными ответами других механосенсорных структур. Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что повышение интенсивности белкового синтеза в *m. soleus* на ранней стадии реадaptации после 14-суточной функциональной разгрузки связано с участием с крайней мере двух сигнальных путей — Akt-независимого через фосфатидную кислоту, активирующую mTORC1, и Akt-зависимого сигнального пути.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы президиума РАН № 7.

ВЛИЯНИЕ СЕРОВОДОРОДА НА ОТВЕТЫ TRPV1-РЕЦЕПТОРОВ НЕЙРОНОВ ТРОЙНИЧНОГО ГАНГЛИЯ КРЫСЫ. © А. Н. Мустафина, Р. А. Гиниятуллин, Г. Ф. Ситдикова. Казанский (Приволжский) федеральный университет, al-must@yandex.ru

Тройничный нерв — V пара черепно-мозговых нервов, состоящая из чувствительных и двигательных волокон. Нейроны тройничного ганглия передают болевые стимулы от кожи, слизистых поверхностей, мозговых оболочек, поэтому изучение механизмов передачи ноцицептивных сигналов является важным в изучении и понимании определенных форм острых и хронических болей. Известно, что TRPV1-рецепторы, агонистом которых является капсаицин, играют важную роль в передаче боли. Активация TRPV1-рецепторов в нервных окончаниях вызывает вход Na и Ca в клетку, деполаризацию мембраны и освобождение нейромедиаторов. Все больше появляется данных об участии нового газомедиатора — сероводорода (H_2S) — в ноцицепции. Известно, что донор H_2S — NaHS — активирует капсаицин-чувствительные сенсорные нейроны в изолированных мочевых пузырях крыс путем активации TRPA1-каналов, однако данные о влиянии H_2S на TRPV1-рецепторы тригеминальных нейронов еще не до конца изучены. В связи с этим целью нашей работы явилось исследование влияния NaHS на ответы TRPV1-рецепторов тригеминальных нейронов. Эксперименты проводили на культуре нейронов тройничных ганглиев, изолированных из 9—12-суточных крыс. Животных подвергали декапитации, после чего тройничные ганглии извлекали и перемещали в холодную среду F12, содержащую пенициллин и стрептомицин. После этого ганглии помещали в ферментативный раствор, содержащий среду F12, трипсин (0.25 мг/мл), коллагеназу (1 мг/мл) и ДНКазу (0.2 мг/мл), и затем в термостат на 25 мин для диссоциации нейронов. Диссоциированные в нейроны ганглии были посажены на стекла, предварительно обработанные poly-L-lysine, и помещены в инкубатор (37 °C, 5 % CO_2). Для регистрации ионных токов TRPV1-рецепторов в ответ на аппликацию капсаицина (1 мкМ) использовали метод patch-clamp в конфигурации whole-cell. Клетки постоянно перфузировали раствором

следующего состава (в mM): 148 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 Hepes и 10 D-Glucose, pH7.2. Внутритрехочный раствор содержал (в mM): 130 CsCl, 5 MgCl₂, 10 Hepes, 5 EGTA, 0.5 CaCl₂, 2 Mg-ATP, 0.5 Na-GTP и 5 KCl, pH7.2. Капсаицин в концентрации 1 мкМ апплицировали с использованием системы быстрой аппликации в течение 2 с. В качестве донора H₂S использовали NaHS, так как в водных растворах он диссоциирует до иона натрия (Na⁺) и гидросульфидного аниона (HS⁻), который реагирует с протоном (H⁺), образуя H₂S. В тригеминальных нейронах в контроле амплитуда ответов TRPV1-рецепторов на аппликацию капсаицина в концентрации 1 мкМ составила 2470.9 ± 1168.9 pA (*n* = 5). В течение 5 мин аппликации NaHS амплитуда ответов на капсаицин повышалась до 3680.4 ± 1689.4 pA (*n* = 5). Однако к 15-й мин аппликации NaHS амплитуда снизилась до 273.5 ± 139.1 pA (*n* = 5), что на 76.8 ± 12.7 % меньше контрольных значений (*n* = 5, *P* < 0.05). В присутствии ДТТ (дитиотреитола) не наблюдали начального повышения амплитуды ответа на капсаицин в присутствии NaHS, но к 15-й мин ответы на аппликацию капсаицина также снижались, эффект составил 41 ± 13.99 % от контрольных значений (*n* = 5, *P* < 0.05). Таким образом, было показано, что донор сероводорода оказывает двухфазное влияние на ответы TRPV1-рецепторов, вызывая первичное усиление ответа и последующее уменьшение, при этом первичный эффект может быть связан с восстанавливающим действием NaHS на TRPV1-рецепторы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-15-00618).

ДИНАМИКА ТРАНСПОРТНЫХ БЕЛКОВ НЕРВНОГО ОКОНЧАНИЯ ЛЯГУШКИ В УСЛОВИЯХ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ С РАЗЛИЧНОЙ ЧАСТОТОЙ ИМПУЛЬСОВ. © А. Р. Мухитов,¹ Р. И. Гильманова,¹ М. М. Гафаров,² Л. Ф. Минигулова.³ ¹ Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, regina.gilmanova@qir.ru, ² Казанский государственный медицинский университет, и ³ Казанский (Приволжский) федеральный университет.

Транспортные белки обеспечивают перемещение везикул, органелл и других веществ в клетке. Основные белки этого типа классифицируются по компонентам цитоскелета, с которыми они взаимодействуют. Два основных моторных белка, взаимодействующих с тубулиновым цитоскелетом, — кинезин и динеин. У мыши суперсемейство кинезинов включает в себя 15 семейств белков, различающихся по аминокислотному составу, расположению функциональных доменов и специализации в транспортных процессах (Hirokawa et al., 2009). Кинезин KIF5 относится к N-кинезином, у которых моторный домен находится на NH₂-конце молекулы. Его гомолог выявлен и у лягушки (Lu et al., 2013). KIF5 перемещается к плюс-концу микротрубочек цитоскелета. Его функции в клетке многообразны: KIF5 обеспечивает транспорт таких органелл, как митохондрии и лизосомы, а также перемещает везикулы и их предшественники, предшественники плазматической мембраны, белковые комплексы и комплексы мРНК-белок. Цитоплазматический динеин, напротив, перемещается к минус-концу микротрубочки и обеспечивает транспорт в этом направлении (Lodish et al., 2000). В аксоне тубулиновый цитоске-

лет ориентирован плюс-концом к нервному окончанию. Таким образом, в нервной терминали кинезин обеспечивает anterogradный транспорт веществ и органелл, в то время как динеин отвечает за retrogradный транспорт (продукты эндоцитоза перемещаются к лизосомам и т. д.) (Hirokawa et al., 2009). Целью нашей работы было исследовать динамику кинезина и динеина в нервном окончании лягушки при электрической стимуляции нерва с различной частотой импульсов. Исследования проводили на нервно-мышечных синапсах кожно-грудинной мышцы лягушки *Rana ridibunda*. Визуализацию элементов цитоскелета осуществляли с помощью лазерного конфокального микроскопа Leica SP5 TCS MP. Микротрубочки были выявлены с помощью моноклональных антител к альфа-тубулину (Sigma). Кинезин и динеин выявляли с помощью поликлональных антител к кинезину KIF5 (Sigma) и динеину (Sigma) соответственно. Пре- и постсинапс дифференцировали с помощью маркеров пре- и постсинаптической мембраны — меченных флуоресцентными маркерами FITC и TRITC лектина PNA (peanut agglutinin lectin) (Sigma) и альфа-бунгаротоксина (Sigma) соответственно. Электрическую стимуляцию нерва проводили с использованием техники всасывающего электрода. Анализ и статистическую обработку данных проводили с помощью программ ImageJ, LSM 4.0 и LAS AF. В наших экспериментах мы применяли электрическую стимуляцию с частотами 10 и 100 Hz в растворе Рингера в течение 5 мин с последующей фиксацией в параформальдегиде (4 %). В других вариантах стимулированные мышцы фиксировали после 5 мин отдыха. Как показали наши исследования, стимуляция как с низкой (10 Hz), так и с высокой (100 Hz) частотой вызывает перераспределение кинезина к дистальной части нервной терминали, при этом после низкочастотной стимуляции и 5 мин релаксации распределение кинезина возвращалось к контрольному, а при высокочастотной стимуляции сохранялось преобладание кинезина в конце нервного окончания. При этом мы не наблюдали изменений в распределении динеина по терминали во всех вариантах электрической стимуляции. Такая динамика моторных белков может объясняться разной потребностью клетки во внутриклеточном транспорте при разной интенсивности электрической стимуляции.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-01595 а).

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ СИГНАЛЬНОГО БЕЛКА TGFβ2 В ПРЕНАТАЛЬНОМ РАЗВИТИИ ГЛАЗА ЧЕЛОВЕКА. © И. Г. Панова, Ю. В. Маркутанова, Н. В. Фирсова, Ю. А. Смирнова, Р. Д. Зиновьева. Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, pinag@mail.ru

В развитии глаза позвоночных важную роль играет несколько семейств сигнальных белков — FGF, TGFα, TGFβ, Hedgehog, Wnt и Notch. Сигнальные белки находятся в тесном взаимодействии с транскрипционными факторами и функционируют в составе многокомпонентных сигнальных путей. Семейство белков TGFβ (TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3) составляет группу полифункциональных ростовых факторов, необходимых для нормального морфогенеза глаза. В глазу млекопита-

ющих и глазу взрослого человека экспрессируются все три изоформы этого семейства. Роль белков семейства TGFbeta в регуляции нормальной дифференцировки тканей глаза была доказана главным образом на моделях глаза мыши. У TGFbeta2-нокаутных мышей выявлены аномалии развития глаза, которые характерны и для людей. Эти аномалии являются следствием нарушения эпителиально-мезенхимных взаимоотношений. В настоящей работе представлены данные о пространственно-временной экспрессии TGFbeta2 в пренатальном развитии тканей глаза человека с 8-й по 31-ю нед беременности человека. TGFbeta2 был выбран в связи с тем, что он является преобладающей изоформой исследуемого белка в тканях глаза человека. В молекулярно-генетических исследованиях (ПЦР-анализ) экспрессия гена TGFbeta2 выявлена нами во всех анализируемых тканях глаза (роговице, хрусталике, сетчатке, цилиарном теле+радужка и пигментном эпителии+сосудистая оболочка) с 9.5-й по 21-ю нед пренатального развития человека. Высокий уровень экспрессии наблюдается вплоть до 17—18 нед пренатального развития, на 21-й нед отмечено существенное снижение уровня экспрессии TGFbeta2 во всех тканях. В иммунохимическом исследовании нами выявлена локализация белка TGFbeta2 в эпителиальных и нейроэпителиальных производных тканей глаза: эпителии роговицы, эпителии хрусталика, во внутренних слоях сетчатки, пигментном эпителии сетчатки, непигментированном эпителии цилиарного тела, с 8-й по 31-ю нед. пренатального развития. И только на 17-й нед локализация этого белка выявлена в мезенхимных производных глаза — в строме цилиарного тела и эндотелии роговицы. Строгая локализация белка TGFbeta2 в сетчатке на границе со стекловидным телом в слое ганглиозных клеток и слое внутренней пограничной мембраны, а также в хрусталике предполагает его участие в качестве важнейшего регулятора ангиогенеза в период, когда идут такие важные события в развитии глаза, как становление и регрессия внутриглазного гиалоидного кровоснабжения, формирование вторичного и третичного стекловидного тела и развитие дефинитивного кровоснабжения сетчатки. Результаты наших исследований свидетельствуют об участии TGFbeta2 в процессах пролиферации и дифференцировки клеток в ходе формирования тканей глаза, имеющих различное эмбриональное происхождение — нейроэктодермальное, нейромезенхимное и эктодермальное, осуществляя контроль морфогенеза глаза в целом.

Авторы выражают благодарность Г. Т. Сухих и Р. А. Полтавцевой (НЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова Министерства здравоохранения России) за предоставление материала глаз для исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-00745) и программы президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития».

БЕЛКИ pRb И p130 СПОСОБСТВУЮТ ИНИЦИИРОВАНИЮ ЖИРОВОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ В МЕЗЕНХИМНЫХ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТКАХ ПУТЕМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С БЕЛКАМИ СЕМЕЙСТВА POLYCOMB.
© Н. С. Петров, Н. А. Верещанина, Б. В. Попов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Жировые клетки происходят из мезенхимных стволовых клеток (МСК), которые у млекопитающих обладают потенциалом к дифференцировке во все мезодермальные некроветворные линии. Иницирование жировой дифференцировки (ЖД) вызывается взаимодействием регуляторных молекул нескольких сигнальных путей, которые влияют на выбор клеточной судьбы в МСК, обладающих потенциалом к дифференцировке в жировые, костные или мышечные клетки. Роль эпигенетических «переключателей» ЖД могут выполнять метилтрансфераза Ezh2 и деметилаза Utx семейства Polycomb (PcG), которые регулируют уровень метилирования 27-го остатка лизина гистона H3 (H3K27), являющегося меткой транскрипционно-неактивного хроматина. В текущей литературе есть данные о том, что активность указанных ферментов регулируется белками семейства продукта гена ретинобластомы (pRb). Цель настоящей работы заключалась в оценке роли pRb и его партнерской молекулы p130 в регуляции активности Ezh2 и Utx в МСК, индуцированных к ЖД. Для достижения этой цели мы использовали мышинные МСК линии С3Н10Т1/2 с конститутивной экспрессией экзогенного pRb дикого типа ($\Delta B/X$), неактивного pRb с мутацией в функциональном Т-антигенсвязывающем домене ($\Delta S/N$) или стабильно активного pRb с мутациями 8 сайтов фосфорилирования ($\Delta p34$). Клетки индуцировали к ЖД путем культивирования в ростовой среде, содержащей индометацин, дексаметазон, 3-изобутил-1-метилксантин и инсулин. ЖД оценивали через 0, 7, 10 и 14 сут после начала индукции с помощью световой микроскопии клеток, окрашенных масляным красным, и спектрофотометрического измерения количества красителя, экстрагированного из окрашенных МСК. Результаты ПЦР в реальном времени показали, что при индукции ЖД в МСК всех линий повышается экспрессия RB, сочетающаяся с увеличением уровня мРНК p130 в клетках линий, продуцирующих функционально активный pRb, но его снижением в клетках $\Delta S/N$, продуцирующих нефункциональный pRb. Аналогичным образом изменяется экспрессия тканеспецифического индуктора ЖД PPAR гамма, Ezh2, Utx и Bmi1 — члена семейства PcG, являющегося маркером функционально активных стволовых клеток различной тканевой специфичности. Предварительная инактивация Bmi1 путем трансдукции лентивирусом FUGW-H1, кодирующим специфическую shRNA, замедляло в клетках всех линий ЖД, снижало экспрессию pRb, p130 и PPAR гамма. Эти изменения были сопряжены с уменьшением активации Ezh2 и Utx. Результаты нашей работы соответствуют опубликованным данным о том, что Ezh2 и Utx могут выполнять роль эпигенетического переключателя при выборе МСК жировой судьбы путем изменений уровня метилирования H3K27 на промоторах тканеспецифических регуляторных генов, таких как PPAR гамма. При этом изменение активности указанных ферментов иницируется членами семейства pRb и может опосредоваться белком Bmi1.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-31115).

АКТИНОВЫЙ ЦИТОСКЕЛЕТ В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА NF- κ B В КЛЕТКАХ ЭПИДЕРМОИДНОЙ КАРЦИНОМЫ A431.

© О. А. Петухова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, petukhova@yandex.ru

Активный цитоскелет принимает участие в разнообразных процессах немышечных клеток, таких как миграция, дифференцировка, внутриклеточный транспорт и сигналинг. Одной из самых важных характеристик цитоскелета является его способность к быстрой реорганизации под влиянием факторов роста, межклеточной адгезии и адгезии к белкам внеклеточного матрикса. Существуют доказательства того, что реорганизация актинового цитоскелета индуцирует модуляцию активности транскрипционных факторов. NF-κB принадлежит к семейству транскрипционных факторов, которые индуцируются различными стимулами. Наиболее широко распространенной субъединицей NF-κB является RelA/p65, которая образует гомодимеры или гетеродимеры с субъединицей p50. Значительная доля RelA/p65 находится в цитоплазме в ассоциации с членами семейства ингибиторов, IκB-белками. Стимуляция клеток приводит к фосфорилированию и дальнейшей деградации IκB и ядерной транслокации NF-κB. В ядре NF-κB взаимодействует с консенсусной последовательностью разнообразных генов и регулирует их активность. Несмотря на значительный прогресс в понимании ядерных функций NF-κB, представления о механизмах транспорта в ядро и цитоплазматической локализации далеки от ясности. Первоначальные данные, полученные в нашей лаборатории, свидетельствуют о колокализации NF-κB со структурами актинового цитоскелета в цитоплазме различных клеток и о взаимодействии NF-κB с иммобилизованным фибриллярным актином. Это позволило предположить, что распределение NF-κB в цитоплазме происходит в зависимости от состояния актина. В качестве модели использовали клетки эпидермоидной карциномы A431, которые распластывали на фибронектине, что приводило к формированию стресс-фибрилл более чем у 70 % клеток. Под воздействием ряда стимулов, одним из которых является ЭФР, происходит реорганизация актинового цитоскелета. Характерные черты этой реорганизации наблюдаются у большинства клеток популяции. Эти особенности ответа клеток на адгезию и воздействие ЭФР обеспечивают возможность интерперетации результатов в контексте клеточного ответа, присущего клеточной популяции в целом. Анализ распределения RelA/p65, субъединиц p50, а также ингибиторной субъединицы IκB в субклеточных фракциях клеток A431, распластанных на фибронектине и стимулированных ЭФР, показал, что около 7 % клеточного пула RelA/p65 выявляется в цитоскелетной фракции, которая не содержит ингибиторной субъединицы IκB. Напротив, фракция свободных белков цитоплазмы содержала около 50, а мембранная — около 30 % клеточного пула RelA/p65, которые также содержали IκB. Причем RelA/p65 мембранной фракции активировался ЭФР путем деградации IκB альфа, а в цитоскелетной фракции стимуляция ЭФР приводила к трехкратному накоплению RelA/p65. Взаимодействие RelA/p65 с актиновым цитоскелетом подтверждается данными иммунофлуоресценции и электронной микроскопии. Результаты предполагают особый, возможно активированный, статус NF-κB, связанного с цитоскелетом. Для проверки этого предположения был проведен анализ динамики распределения актина и RelA/p65 в экспериментах с живыми клетками. Кроме того, были проведены детальный иммунофлуоресцентный и Вестерн-блот-анализ распределения и ядерной

транслокации RelA/p65, а также анализ ДНК-связывающей активности клеток, распластанных на фибронектине и стимулированных ЭФР в присутствии стабилизирующих и дестабилизирующих актинового цитоскелета агентов. Анализ живых клеток, а также конфокальная микроскопия показали перемещение RelA/p65 в цитоплазме, стимулированное ЭФР. Помимо колокализации со стресс-фибриллами и раффлами RelA/p65 после воздействия ЭФР был обнаружен в особых дискретных актинсодержащих структурах, которые содержали также белки адгезии и сигнальные молекулы. ЭФР индуцировал ядерную транслокацию в присутствии агентов, стабилизирующих и дестабилизирующих актинового цитоскелета. Регуляция ДНК-связывающей активности наблюдалась в клетках с дестабилизированным цитоскелетом. По-видимому, ЭФР стимулирует в клетках A431 два динамических потока RelA/p65 одновременно — в ядро и к периферии клетки. Обсуждаются гипотезы, объясняющие роль актинсвязанного RelA/p65, и приводятся данные, подтверждающие участие актинсвязывающего белка, актинина 4, в регуляции активности NF-κB.

Работа выполнена при финансовой поддержке the Swedish Institute (Visby program 879/2009), the Swedish Research Council (2010-3045), postdoctoral fellowship at the Faculty of Health Science, Linköping University, МКБ РАН и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-00497).

ВЛИЯНИЕ НАРУШЕНИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ И СНИЖЕНИЯ ПРОДУКЦИИ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ НА ПОВЫШЕНИЕ ТОНУСА ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК.
© А. В. Печерский. Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова, Санкт-Петербург.

После 35—40 лет у людей наблюдается снижение пула плюрипотентных стволовых клеток, приводящее к недостаточности пополнения клеточного состава камбиальных зон, неполному замещению гибнущих старых клеток и как следствие к прогрессированию развития атрофических изменений в подавляющем числе тканей. В ответ окружающие эпителиальные и эндотелиальные клетки, а также привлеченные гибелью старых клеток макрофаги образуют клеточные факторы роста, стимулирующие деление клеток ростовых зон. С увеличением возраста количество клеток камбиальных зон, несмотря на возрастающую стимуляцию клеточными ростовыми факторами, уменьшается. Соответственно продукция клеточных ростовых факторов, направленная на дополнительную стимуляцию пролиферации клеток камбиальных зон, усиливается и становится постоянной, приводя к метаплазии, а затем к малигнизации (Печерский и др., 2008). При возрастном снижении продукции половых гормонов, необходимых для деления и дифференцировки несущих их рецепторы клеток (в частности, при частичном возрастном андрогенном дефиците у мужчин), у лиц после 35—40 лет компенсаторно повышается продукция по аутокринно-паракринному механизму клеточных ростовых факторов (инсулиноподобного фактора роста, эпидермального фактора роста, основного фактора роста фибробластов и др.) (Печерский и др., 2003, 2006). Повышение уровня клеточных ростовых факторов, обусловленное незавершенностью регенерации после гибели ста-

рых клеток, дополняется повышением уровня аналогичных ростовых факторов, обусловленное нарушением развития андрогензависимых клеток. Снижение продукции тестостерона приводит также к увеличению уровней лютеинизирующего, фолликулостимулирующего, паратиреоидного и аденокортикотропного гормонов, а также к уменьшению амплитуды их импульсной инкретиции (Rechtersky et al., 2002; Печерский и др., 2006). Имея пептидную структуру, данные гормоны связываются с комплементарными рецепторами на клеточной поверхности, инициируют сAMP-путь передачи сигнала (Alberts et al., 1994; Lavin, 1999). Наравне с сAMP и сGMP необходимо принимать во внимание третий — инозитолфосфолипидный путь (Ca^{2+} — мессенджерную систему) от поверхностных клеточных рецепторов. Через инозитолфосфолипидный путь передачи сигнала, так же как и через каталитические рецепторы с тирозин-специфической протеинкиназной активностью, реализуется митогенный эффект большинства клеточных факторов роста. Эффект ряда клеточных факторов роста (при вовлечении Ca^{2+} -мессенджерной системы) опосредован образованием диацилглицерола. Диацилглицерол активизирует протеинкиназу C, что сопровождается стимуляцией пролиферации клеток. Данному процессу сопутствует освобождение Ca^{2+} из клеточных хранилищ, приводящее к повышению тонуса гладкомышечных клеток. Диацилглицерол в последующем распадается до арахидоновой кислоты, необходимой для синтеза простагландинов. Вышеописанные процессы, вызывая повышение тонуса гладкомышечных клеток, способствуют нарушению микроциркуляции, развитию гипертонической болезни, дизурии (вследствие повышения тонуса гладких мышц мочевого пузыря и предстательной железы) и других заболеваний и синдромов у людей старше 35—40 лет. Обратное развитие вышеописанных патологических процессов можно получить при назначении заместительной терапии половыми гормонами, а также восстановлением регенерации при трансфузии мононуклеарной фракции периферической крови от молодых доноров 18—23 лет одних с реципиентом групп крови и пола (патент РФ № 2350340; Печерский и др., 2008, 2010, 2014).

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА ПРОДУКТА ГЕНА РЕТИНОБЛАСТОМЫ В РЕГУЛЯЦИИ СОСТОЯНИЯ ПОКОЯ В МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ. © Б. В. Попов, Н. С. Петров, Н. А. Верещагина, И. В. Евсюков. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Регуляция состояния покоя играет ключевую роль в дифференцировке, пластичности и предотвращении злокачественной трансформации стволовых клеток. Поддержание клеточного покоя находится под контролем «пocketных» белков — членов семейства продукта гена ретинобластомы (pRb), однако их роль в регуляции клеточного цикла мезенхимных стволовых клеток (МСК) остается неизученной. В настоящей работе мы исследовали взаимодействие двух pocketных белков — pRb и p130 — в формировании различных комплексов с белками семейства E2F на ДНК ((pp)-E2f-ДНК) в покоящихся МСК, конститутивно продуцирующих различные формы экзогенного pRb. Клеточный цикл и продукцию pocketных белков в МСК (полипотентные клетки линии СЗН10Т1/2) оценивали с помощью построения кривых

роста, проточной цитометрии и иммуноблотинга синхронизированных МСК в сравнении с таковыми для соматических дифференцированных клеток установленных линий Т98G и HeLa, продуцирующих соответственно функциональный и нефункциональный p130. Взаимодействие pRb и p130 в формировании различных комплексов pp-E2f-ДНК определяли с помощью метода задержки электрофоретической подвижности в геле (EMSA). С целью экспрессии экзогенного pRb клетки 10Т1/2 были стабильно трансфицированы векторами, содержащими ген мышинового RB «дикого» и мутантного типов, соединенный с последовательностью, кодирующей эпитоп гемагглютинина вируса гриппа (HA). Экспрессию экзогенного RB оценивали путем полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и иммуноблотинга с помощью праймеров и антител, выявляющих эпитоп HA. Мы обнаружили, что клетки HeLa в условиях роста в среде, лишенной фетальной сыворотки, не входят в состояние покоя и не образуют комплексов p130/p107-E2f4-ДНК, несмотря на продукцию функционального pRb и формирование комплексов pRb-E2f1-ДНК. Напротив, МСК, подобно контрольным клеткам линии Т98G, входят в состояние покоя и формируют различные комплексы pp-E2f-ДНК, идентичные по рисунку электрофоретической подвижности, но отличающиеся по структуре от таковых в клетках Т98G. Продукция дикого или мутантного типа экзогенного pRb в МСК повышает синтез мРНК и белка, кодируемого общеклеточным RB, но не способствует формированию комплексов pRb-E2f-ДНК. Однако в этих условиях формируются комплексы, содержащие p130/p107-E2f4-Cdk2-CycE/A-ДНК (p130-E2f4-cycE/A-ДНК). Результаты нашей работы показывают, что pRb способствует эффекторной функции p130 в регуляции состояния покоя МСК, а конститутивная экспрессия экзогенного pRb вызывает образование комплексов p130-E2f4-cycE/A-ДНК в покоящихся клетках.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068).

СРАВНЕНИЕ УРОВНЕЙ ЭКСПРЕССИИ СИГНАЛЬНЫХ БЕЛКОВ КАСКАДА В-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА В НОРМАЛЬНЫХ В-КЛЕТКАХ И ПРИ В-ХЛЛ МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ. © Д. М. Поташиникова,¹ А. А. Гладких,¹ И. А. Воробьев.^{1,2} ¹ Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, alinagladkikh@gmail.com, и ² Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

Сигнальный каскад от В-клеточного рецептора (ВКР) является основным сигнальным каскадом у нормальных и опухолевых В-клеток, обеспечивающим их выживание и пролиферацию. Среди В-клеточных опухолей, для которых показано нарушение проведения сигнала от В-клеточного рецептора, наиболее значимым является В-клеточный хронический лимфолейкоз (В-ХЛЛ) как наиболее встречающийся и клинически гетерогенный тип В-зрелоклеточной лимфомы. Существует много данных о нарушениях экспрессии компонентов ВКР на уровне белка, но до настоящего времени практически отсутствуют работы о различиях в уровне экспрессии сигнальных тирозинкиназ в нормальных и опухолевых В-лимфоцитах на

уровне мРНК. В настоящей работе проведено сравнение отсортированных субпопуляций опухолевых лимфоцитов В-ХЛЛ (конститутивно экспрессирующих поверхностный маркер CD5), нормальных В-лимфоцитов из периферической крови (не экспрессирующих CD5) и субэпителиальной зоны миндалин человека (экспрессирующих CD5 и фенотипически более близких к В-ХЛЛ) по уровням экспрессии генов сигнальных белков ВКР-каскада. Методом ПЦР в реальном времени оценивали уровни экспрессии мРНК генов *CD79A*, *CD79B*, *LYN*, *SYK*, *SHPI(PTPN6)* и *ZAP70*; в качестве референтных генов для нормализации данных использовали гены *UBC*, *YWHAZ* и *HPRT1*. Нормальные CD5– В-клетки из периферической крови и CD5+ В-клетки из ткани миндалин статистически достоверно различаются между собой только по уровню экспрессии мРНК гена сигнальной тирозинкиназы *ZAP70* (медиана относительного нормализованного количества кДНК для CD5– В-клеток 0.081, для CD5+ В-клеток 0.223). Уровень экспрессии мРНК гена *ZAP70* также позволил достоверно разделить выборку опухолевых лимфоцитов В-ХЛЛ на две группы: *ZAP70high* (медиана относительного нормализованного количества кДНК 0.31) и *ZAP70low* (медиана относительного нормализованного количества кДНК 0.01). Каждая из групп В-ХЛЛ имела свой уникальный профиль экспрессии генов сигнальных белков, отличающийся как от CD5– нормальных В-клеток крови, так и от CD5+ В-клеток миндалин. Между собой *ZAP70high* и *ZAP70low* подгруппы В-ХЛЛ достоверно различались по уровням экспрессии всех исследованных компонентов ВКР-каскада, за исключением гена тирозинкиназы *LYN*, уровень экспрессии мРНК которого был снижен во всех опухолевых лимфоцитах по сравнению с нормальными. Медианы относительного нормализованного количества кДНК для исследованных генов составили: в группе *ZAP70low* 7.232 (*CD79A*), 0.700 (*CD79B*), 0.267 (*SYK*), 0.187 (*LYN*) и 0.255 (*SHPI*); в группе *ZAP70high* 4.830 (*CD79A*), 2.565 (*CD79B*), 2.248 (*SYK*), 0.205 (*LYN*) и 1.573 (*SHPI*). Таким образом, существует общий паттерн экспрессии генов сигнальных белков ВКР-каскада для нормальных В-клеток независимо от их иммунофенотипа и гистологической локализации. Исключение составляет ген *ZAP70*, уровень экспрессии мРНК которого позволяет дифференцировать различные группы нормальных и опухолевых В-лимфоцитов и указывает на ключевую регуляторную роль этой тирозинкиназы в патогенезе В-ХЛЛ.

Работа выполнена с использованием оборудования, приобретенного за счет средств программы развития Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова и при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-40189-Н).

ДЕПОЛЯРИЗУЮЩИЙ ЭФФЕКТ АКТИВАЦИИ NMDA-РЕЦЕПТОРОВ ПОСТСИНАПТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЕЧНЫХ ВОЛОКОН МЛЕКОПИТАЮЩЕГО. © С. Е. Проскура, ^{1,2} К. А. Петров, ^{1–3} А. И. Маломуж, ^{1–3} Е. Е. Никольский. ^{1–4} ¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, svetlana-proskurina@mail.ru, ² Казанский институт биохимии и биофизики, ³ Институт органической и физической химии им. А. Е. Арбузова, Казань, и ⁴ Казанский государственный медицинский университет.

Нарушение работы или недостаточный уровень экспрессии глутаматных N-метил-D-аспаратных (NMDA) рецепторов лежат в основе большого числа патологий мозга, в связи с чем эти рецепторы стали рассматриваться в качестве мишени для большого числа нейроактивных фармакологических препаратов. Установлено, что в центральной нервной системе данный тип глутаматных рецепторов в той или иной мере участвует в процессах нейрональной возбудимости, синаптической пластичности (Cotman et al., 1987), эксайтотоксичности при нейродегенеративных заболеваниях, а также в патогенезе эпилепсии и судорог. При этом до недавнего времени наличие и активность NMDA-рецепторов за пределами ЦНС даже не рассматривались. Относительно недавно нами было показано участие этих рецепторов в модуляции процессов выделения ацетилхолина (Malomouzh et al., 2003) и регуляции активности ацетилхолинэстеразы (Petrov et al., 2013) в нервно-мышечном синапсе млекопитающего. Более того, показана постсинаптическая локализация NR1-субъединицы NMDA-рецепторов (Malomouzh et al., 2011). Такая локализация позволяет предполагать возможность изменения возбудимости (развития деполаризации) мышечного волокна при аппликации агониста этого типа ионотропных глутаматных рецепторов. Проверка данного предположения и легла в основу настоящей работы, проведенной методами стандартной микроэлектродной электрофизиологии на препарате мышцы длинного разгибателя пальцев крысы. Нами было установлено, что глутамат в присутствии глицина (необходимого коагониста NMDA-рецепторов) действительно вызывает деполаризацию мембраны скелетного мышечного волокна. Этот деполаризирующий эффект аминокислот практически полностью отсутствует на фоне селективного конкурентного блокатора NMDA-рецепторов 2-амино-5-фосфовалериановой кислоты, что позволяет предполагать ключевую роль именно NMDA-рецепторов в реализации деполаризирующего эффекта аминокислот. Тот факт, что полностью действие глутамата не устраняется блокатором, может быть связан с наличием на мембране иного типа глутаматных ионотропных рецепторов (что маловероятно) или же с более высокой аффинностью рецепторов к глутамату (что более вероятно).

Результаты нашей работы показывают, что на постсинаптической мембране мышечного волокна млекопитающего имеет место функционально активная популяция NMDA-рецепторов, в результате активации которых может не только изменяться возбудимость мышечного волокна, но и запускаться широкий спектр внутриклеточных реакций через систему кальцийактивируемых вторичных посредников (что обусловлено относительно высокой пропускающей способностью канала NMDA-рецептора для ионов кальция). С учетом разнообразия возможных, опосредуемых NMDA-рецепторами функций дальнейшее изучение их роли в работе нервно-мышечного синапса представляется крайне актуальной задачей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 14-04-01788 и 13-00-40286-К).

ДЕПОУПРАВЛЯЕМЫЕ КАЛЬЦИЕВЫЕ КАНАЛЫ И ПАТОЛОГИЯ НАСЛЕДСТВЕННОЙ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА. © М. А. Рязанцева, ¹ А. А. Гончарова, ² К. В. Скобелева, ¹ Е. В. Казначеева. ^{1,1} Институт цитологии

РАН, mariaandreevna@gmail.com, и ² Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург.

Большинство случаев (до 50 %) наследственной болезни Альцгеймера (БА) происходит в результате мутации в гене белка пресенилин-1. Белок пресенилин-1 является протеазой, входящей в состав сложного фермента гамма-секретазы. В процессе созревания белок пресенилин-1 разрезает сам себя, давая затем два терминальных фрагмента, входящих в состав гамма-секретазы. Ранее было обнаружено, что мутации в этом гене приводят к нарушению ферментативной активности и накоплению неразрезанной формы белка пресенилин-1 в тканях головного мозга пациентов с БА. В случае спорадической формы болезни также происходит увеличение количества белка и матричной РНК гена белка пресенилин-1. Ранее было сделано предположение, что накопление неразрезанного белка пресенилин-1 приводит к нарушению кальциевого гомеостаза в нейронах, что приводит в конечном счете к нарушениям памяти. Депоуправляемые кальциевые каналы играют важную роль в работе нейронов, опосредуя запуск долговременной потенциации и выброса нейромедиатора. Нарушение их работы может быть связано с патологическими процессами при БА. Цель работы. Исследовать нарушения работы депоуправляемых кальциевых каналов в животных и клеточных моделях БА. Материал и методика. Метод локальной фиксации потенциала (patch-clamp technique) с записью токов через мембрану одиночной клетки. Измерение внутриклеточной концентрации кальция с флуоресцентным зондом Fura-2. Иммуноблоттинг. Конфокальная микроскопия с живыми клетками. Получение первичных культур нейронов мыши с лентивирусной трансдукцией мутантных генов белка пресенилин-1 человека, связанных с БА. Трансгенные *Drosophila melanogaster* линии PS1-DE9, созданной в лаборатории, с экспрессией мутантного гена белка пресенилин-1 человека в холинергической нервной системе. Тестирование памяти *D. melanogaster* на основе стереотипного полового поведения. Статистическая обработка данных произведена в программе Origin8. Результаты. Было обнаружено значительное усиление активации депоуправляемых кальциевых каналов в нейронах гиппокампа мышей, моделирующих БА с накоплением неразрезанного белка пресенилин-1. Причиной усиления их активации является гиперактивность внутриклеточных белков—кальциевых сенсоров STIM1, передающих сигнал на депоуправляемые каналы. При этом уровень экспрессии этих сенсоров и других регуляторных сигнальных молекул и канальных субъединиц депоуправляемых каналов не претерпели изменения. Устранение гиперактивности депо-управляемых кальциевых каналов с помощью специфического ингибитора 2-аминоэтоксидифенил бората восстанавливал нормальный уровень активности кальциевых каналов в культурах и элиминировало нарушения кратковременной памяти у трансгенных *D. melanogaster*. Таким образом, депоуправляемые кальциевые каналы являются возможной молекулярной мишенью для устранения нарушений памяти при наследственной форме БА.

ВЛИЯНИЕ ИНТЕГРИНОВ НА АДГЕЗИЮ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА, К БЕЛКАМ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА.

© И. П. Савченкова, Е. А. Савченкова. Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я. Р. Коваленко РАН, Москва, s-ip@mail.ru

Имеющиеся данные не до конца раскрывают роль выявленных к настоящему времени сигнальных факторов в определении судьбы стволовой клетки из-за сложности ее взаимодействия с микроокружением. В передаче пространственной информации от микроокружения к клетке участвуют сложные мембранные молекулы, которые в зависимости от сигнала способствуют клеточной адгезии или миграции. Клетки получают сигнал к миграции или к фокальной адгезии путем взаимодействия мембранных клеточных рецепторов, например интегринов, с белками внеклеточного матрикса (ВКМ), с одной стороны, и белками цитоскелета — с другой. Ранее нами было показано изменение экспрессии пяти генов интегринов в результате длительного культивирования мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК), выделенных из подкожно-жировой ткани (ПЖТ) человека (Савченкова И. П., Савченкова Е. А., 2014). Результаты сравнительного анализа ММСК на 2-м и 17-м пассажах культивирования выявили значительное снижение количества клеток, положительно меченных антителами (АТ) против CD49a ($\alpha 1$ -интегрин — рецептор для коллагена и ламинина) и CD49d ($\alpha 4$ -интегрин — рецептор для фибронектина), на 87.2 и 11.2 % соответственно. Доля клеток, положительно окрашенных АТ против CD49f ($\alpha 6$ -интегрин — рецептор для ламинина) и CD49b ($\alpha 2$ -интегрин — рецептор для коллагена и ламинина), наоборот, увеличивалась в течение длительного культивирования на 9.9 и 2.3 % соответственно. Высокая экспрессия интегрин $\beta 1$ (98 %) ММСК существенно не изменялась во время длительного культивирования. Так как белки ВКМ являются лигандами к α -интегринам, представляло интерес оценить эти клетки по адгезии и распластыванию к матрицам, представленным коллагеном типа 1, фибронектином и ламинином. Предварительно обработанные (Repell-Silane, Sigma) покровные стекла покрывали коллагеном, фибронектином и ламинином (Sigma) в концентрации 10 мкг/мл и инкубировали в течение 16 ч при 4 °С для иммобилизации белков. Клеточную суспензию (100 мкл) ММСК в концентрации 1×10^6 кл./мл наносили на предварительно отмытые стекла с лигандами и инкубировали в течение 3 ч. Для визуализации фибриллярного актина использовали краситель TRITC-фаллоидин (Sigma) в конечной концентрации 50 мкг/мл. Эффективность прикрепления оценивали по количеству прикрепившихся клеток на 1 см² через 24 ч после посадки плотностью 3000 клеток на 1 см² на иммобилизованные белки ВКМ. Статистический анализ проводили с помощью пакета программ MS Excel. Считается, что актиновая составляющая цитоскелета наиболее лабильна среди основных структур цитоскелета. Окрашивание ММСК на 2-м и 17-м пассажах культивирования с помощью TRITC-фаллоидина не выявило значительных изменений в пространственной организации актинового цитоскелета. Однако клетки на 2-м и 17-м пассажах культивирования различались между собой по способности прикрепляться к белкам ВКМ. Количество клеток на 2-м пассаже, прикрепленных к коллагену и фибронектину, превосходило число клеток на 17-м пассаже в 5 и 2 раза соответственно. В то время как число клеток, адгезируемых к ламинину на 2-м пассаже, было меньше по сравнению с клетками на 17-м пассаже в

2 раза. Таким образом, изменение экспрессионного профиля генов интегринов в результате длительного культивирования ММСК влияет на адгезию этих клеток к белкам ВКМ.

К ВОПРОСУ О РОЛИ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ ТАЙТИНА В РАЗВИТИИ МЫШЕЧНОЙ АТРОФИИ.

© Н. Н. Салмов,¹ И. М. Вихлянцева,¹ Грицына,¹ А. Д. Уланова,^{1,2} З. А. Подлубная.^{1,2} ¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, vikhlyantsev@iteb.ru, и ² Пущинский государственный естественно-научный институт.

Тайтин (титин/коннектин, мол. масса 2000—3800 кДа) — гигантский белок саркомерного цитоскелета поперечнополосатых мышц позвоночных. Молекулы тайтина длиной более 1 мкм перекрывают половину саркомера от М-линии до Z-диска, формируя третью филаментную систему в миофибриллах. В А-зоне саркомера тайтин связан с толстыми (миозиновыми) нитями. Эта часть молекулы получила название Т2 (мол. масса 2000 кДа). В I-зоне саркомера некоторые участки молекулы тайтина взаимодействуют с тонкими (актиновыми) нитями, однако большая часть его молекулы в этой зоне проходит свободно, формируя эластичное соединение между концами миозиновых нитей и Z-диском. На каждую миозиновую нить в половине саркомера приходится шесть молекул тайтина, N-концы которых перекрываются в Z-диске, а C-концы — в М-линии саркомера. Большая часть (~90 %) молекулы тайтина состоит из повторяющихся иммуноглобулиноподобных (IgC2) и фибронектиноподобных (FnIII) доменов с β -складчатой структурой. Кроме этих доменов тайтин содержит уникальные последовательности — киназный домен вблизи М-линии саркомера и эластичные N2A, N2B и PEVK-элементы в I-зоне саркомера. Тайтин — полифункциональный белок, участвующий в поддержании высокоупорядоченной саркомерной структуры, запуске и регуляции актин-миозинового взаимодействия. Как сенсор растяжения и напряжения (механосенсор) тайтин, связываясь со многими белками в саркомере и объединяя их в единую сеть — filament network (Linke W., Hamdani N. *Circ. Res.*, 2014), играет важную роль в процессах внутриклеточной сигнализации. Известна способность этого белка к фосфорилированию *in vivo*. Открыты сайты фосфорилирования тайтина в М-линии, I-зоне и Z-диске саркомера и обнаружено много потенциальных участков для фосфорилирования его молекулы. Известны киназы, фосфорилирующие тайтин: пролинонаправленная ERK1/2 и циклинзависимая РК-2 киназы, протеинкиназы А (PKA), G (PKG) и C (PKCa), киназа, регулируемая экстраклеточным сигналом (ERK2), и Ca²⁺/кальмодулинзависимая киназа (CaMKII δ). Показано, что фосфорилирование/дефосфорилирование растяжимых PEVK- и N2B-последовательностей тайтина сердечной мышцы изменяет жесткость его молекул, что является частью молекулярного механизма, ответственного за изменение эластичности саркомера и мышцы в целом. Функциональная роль фосфорилирования тайтина скелетных мышц неясна. Результаты наших исследований, полученные при изучении изменений содержания и уровня фосфорилирования тайтина в скелетных мышцах, атрофированных в условиях космического полета, при зимней спячке, а также вследствие развития индуцируемых алкоголем нарушений, позволили сделать предположе-

ние о том, что повышение уровня фосфорилирования тайтина приводит к увеличению протеолитической дегградации этого белка и что это в свою очередь вносит вклад в развитие скелетно-мышечной атрофии. В докладе будут представлены результаты этих исследований, а также данные литературы, которые выступают в поддержку сделанного нами предположения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 13-04-00281, 14-04-00112, 14-04-32171, 14-04-92116 и 14-04-32240).

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ РЕЦЕПТОРА ЭФР В МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ.

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

В связи с перспективами применения стволовых клеток в терапии дегенеративных, опухолевых, многих наследственных и других заболеваний детальный анализ регуляторных механизмов, обеспечивающих их жизнедеятельность, чрезвычайно актуален как для осуществления направленных воздействий, так и для выявления возможных негативных побочных эффектов. Одним из источников стволовых клеток являются региональные стволовые клетки, которые присутствуют практически во всех органах и тканях, в том числе мезенхимные стволовые клетки человека (МСК). В работах по изучению свойств МСК было показано, что ЭФР способен усиливать продукцию клетками ряда ростовых факторов и цитокинов, включая фактор роста эндотелия сосудов, фактор роста гепатоцитов, гепаринсвязывающий ЭФР-подобный фактор роста и интерлейкин-6. Однако механизмы реализации эффектов ростовых факторов и внутриклеточная судьба их комплексов с соответствующими рецепторами в МСК практически не исследуются. Также не ставится вопрос о связи эндцитоза рецептора ЭФР с активацией сигнальных путей в клетках. В связи с этим мы выбрали систему «ЭФР—рецептор» в качестве модели для изучения рецепторопосредованного эндцитоза в МСК. ЭФР, действующий на клетку через специфические трансмембранные рецепторы-тирозинкиназы, регулирует широкий спектр клеточных процессов. Поскольку в клетках разного типа уровень экспрессии рецептора ЭФР существенно различается, нам важно было исследовать экспрессию и локализацию рецептора ЭФР в МСК. В качестве объекта были выбраны культивируемые МСК человека из десквамированного эндометрия менструальной крови (эМСК). Окраска рецептора ЭФР с помощью антител в клетках после стимуляции эндцитоза добавлением ЭФР выявила в эМСК определенное количество рецептора ЭФР, достаточное для исследования его ассоциации с белками эндцитозного пути методами иммунофлуоресцентной окраски и конфокальной микроскопии. Мы показали, что через 5 мин после стимуляции эндцитоза добавлением 4 нМ ЭФР в клетках выявляется много мелких везикулярных структур, частично колокализующихся с маркером ранних эндосом EEA1. К 15-й мин эти эндосомы значительно укрупняются, перемещаются от периферии к центру клетки, большая их часть становится ассоциированной с EEA1. Однако через 30—60 мин инкубации колокализация рецептора ЭФР с EEA1 практически не обнаружива-

ется. Мы предполагаем, что рецептор ЭФР способен интернализироваться в ЭМСК в составе эндосом, которые подвергаются созреванию. Таким образом, рецептор ЭФР по мере прохождения по эндоцитозному пути может осуществлять регуляцию важных процессов в клетке. Полученные данные являются предпосылкой для изучения роли рецептора ЭФР в сигнальных процессах в ЭМСК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-50-00068) и программы фундаментальных исследований президиума РАН № 24 по нанотехнологиям.

РОЛЬ ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ КАЛЬЦИЕВОГО МЕТАБОЛИЗМА В ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ СИНАПСАХ ТЕПЛОКРОВНЫХ И ХОЛОДНОКРОВНЫХ. © Д. В. Самигуллин,¹⁻³ Э. Ф. Хазиев,^{1,3} Н. В. Жиляков,³ Э. А. Бухараева,^{1,3} Е. Е. Никольский.^{1,3}
¹ Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, ² Казанский национальный исследовательский технический университет им. А. Н. Туполева и ³ Казанский (Приволжский) федеральный университет.

В нервно-мышечных синапсах теплокровных и холоднокровных животных ацетилхолин, выделяющийся в синаптическую щель, осуществляет передачу сигнала между мотонейроном и мышечной клеткой. Наряду с этой функцией передатчика возбуждения ацетилхолин выполняет функцию модулятора синаптической передачи. Существуют гипотезы о том, что процесс ауторегуляции опосредован изменением пресинаптического уровня кальция (Ca^{2+}) через систему пресинаптических ауторецепторов. Для проверки этой гипотезы в нашей лаборатории была налажена методика оценки пресинаптического уровня кальция в нервно-мышечных синапсах теплокровных и холоднокровных животных. Методика основана на применении флуоресцентных Ca^{2+} -чувствительных одноволновых красителей, которые изменяют интенсивность свечения в зависимости от концентрации Ca^{2+} (Ca^{2+} -транзист) и таким образом позволяют оценивать динамику Ca^{2+} в возбудимых клетках при различных воздействиях. Загрузку Ca^{2+} -красителя — Oregon Green ВАРТА 1 — в НО лягушки осуществляли через культуру нерва. В случае работы на НО теплокровных использовали проникающую сквозь клеточные мембраны форму красителя Fluo3 АМ. При регистрации Ca^{2+} -транзиста в ответ на единичную стимуляцию нерва флуоресцентный сигнал регистрировали быстродействующим фотодиодом, установленным на платформе микроскопа Олимпус ВХ-51 с водно-иммерсионным объективом $\times 60$ и набором необходимых фильтров. Регистрацию Ca^{2+} -транзиста в экспериментах на синапсах мышцы осуществляли на конфокальном микроскопе LEICA TCS SP 5 MP. Данные эксперименты выполняли при высокочастотной стимуляции нерва. Оценивали интегральный Ca^{2+} -транзист, обусловленный накоплением Ca^{2+} в ответ на ритмическую стимуляцию. Это было связано с методическими трудностями регистрации входа Ca^{2+} в ответ на единичное раздражение нерва при использовании конфокального микроскопа. Осуществляли стимуляцию двигательного нерва с частотами 20 и 50 имп/с в течение 30 с.

Проведенное фармакологическое исследование с применением активаторов и блокаторов холинорецепторов показало, что в НО холоднокровных холинэргическая

регуляция Ca^{2+} -метаболизма осуществляется через никотиновые и мускариновые рецепторы М2-подтипа, причем активация этих рецепторов приводит к понижению уровня Ca^{2+} в НО. Напротив, в синапсах теплокровных блокада пресинаптических $\alpha 4\beta 2$ никотиновых рецепторов приводит к понижению уровня Ca^{2+} в НО, и это может свидетельствовать о том, что в условиях частотной стимуляции активация этих рецепторов эндогенным ацетилхолином приводит к повышению пресинаптического уровня Ca^{2+} . Полученные данные указывают на то, что в периферических синапсах как теплокровных, так и холоднокровных животных кальциевый метаболизм является предметом модуляции системой пресинаптических холинорецепторов. В синапсах холоднокровных животных этот тип модуляции работает по принципу отрицательной обратной связи, а в синапсах теплокровных — по принципу положительной обратной связи.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы № 7 президиума РАН и Российского фонда фундаментальных исследований, а также за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ УРОКИНАЗНОЙ СИСТЕМЫ В РЕГУЛЯЦИИ НАПРАВЛЕННОГО РОСТА И ВЕТВЛЕНИЯ КАПИЛЛЯРОВ НА МОДЕЛИ ЕХ VIVO. © Е. В. Семина, К. А. Рубина, В. Ю. Сысоева, В. А. Ткачук. Кафедра биохимии и молекулярной медицины, факультет фундаментальной медицины, Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, e-semina@yandex.ru

Для создания сложной сосудистой сети при ее формировании, а также при росте новых сосудов необходимо обеспечение векторности движения клеток, разрушение тканевых барьеров на их пути и определение траектории движения. Важнейшую роль в регуляции направленного движения клеток играют компоненты фибринолитической системы, а именно урокиназа (uPA), ее рецептор (uPAR) и ингибиторы. uPA — сериновая протеаза, секретируемая всеми типами клеток сосудов. Связываясь на поверхности клеток с uPAR, uPA превращает плазминоген в плазмин, запуская каскад протеолитических реакций, что приводит к локальному разрушению белков внеклеточного матрикса, прямой активации факторов роста сосудов. Если роль uPA и uPAR в ремоделировании сосудов и ангиогенезе охарактеризована, то механизмы навигационной функции uPAR, определяющей траекторию роста сосудов, практически не изучены. В связи с этим для оценки влияния uPA и uPAR на рост и ветвление сосудов была использована трехмерная эксплантная модель аорты мыши в Матригеле. Данный подход позволяет оценить траекторию роста и ветвление капилляров, отрастающих от аорты в Матригель, а также изучить скорость миграции сосудистых и гладкомышечных (ГМК) клеток из эксплантов аорты в Матригель. Мы использовали аорты мышечей, нокаутированных по урокиназе (PLAU), и аорты мышечей дикого типа. Экспланты высаживали в каплю Матригеля и на протяжении 14 сут наблюдали за миграцией сосудистых клеток из аорты в

Матригель. Оказалось, что экспрессия uPAR в эксплантах PLAУ существенно снижена по сравнению с контролем, в то же время спонтанная миграция сосудистых клеток у мышей PLAУ в 2 раза ниже, чем в контроле ($P < 0.05$). Эти данные указывают на участие uPA/uPAR-системы в регуляции миграции сосудистых клеток. Однако визуализация иммунофлуоресцентного окрашивания показала, что у мышей PLAУ снижается миграция ГМК, но миграция эндотелиальных клеток остается прежней. Для того чтобы определить, опосредует ли uPAR направленную миграцию клеток и ветвление капилляроподобных структур, мигрировавших из эксплантов, мы использовали антитела, блокирующие uPAR. При этом наблюдалось усиление ветвления капилляроподобных структур и изменение морфология ГМК: в контроле ГМК имеют веретенообразную форму, а при блокировании uPAR ГМК становятся распластанными, как бы теряя направленность миграции (полярность). Далее мы оценили способность uPA регулировать миграцию клеток. Было показано, что экзогенное введение uPA активирует не только спонтанную миграцию клеток (в 1.6 раза по сравнению с контролем, $P < 0.05$), но также увеличивает скорость миграции сосудистых клеток (в 1.75 раза по сравнению с контролем, $P < 0.05$). Таким образом, при исследовании роли урокиназной системы в регуляции направленного роста и ветвления капилляров *ex vivo* было обнаружено, что миграция гладкомышечных клеток зависит от экспрессии урокиназной системы: uPA стимулирует спонтанную миграцию клеток и увеличивает скорость миграции, а блокирование урокиназного рецептора тормозит оба этих процесса. Кроме того, при блокировании uPAR усиливается ветвление капилляроподобных структур, образованных эндотелиальными клетками, и нарушается морфология ГМК: из веретенообразной формы ГМК приобретают форму распластанный, как бы теряя направленность миграции.

НАТРИЙ-КАЛЬЦИЕВЫЙ ОБМЕННИК ОПРЕДЕЛЯЕТ СТЕПЕНЬ КАЛЬЦИЙЗАВИСИМОЙ ДЕСЕНСИТИЗАЦИИ NMDA-РЕЦЕПТОРОВ НЕЙРОНОВ. © Д. А. Сибаров, Е. Э. Погужельская, П. А. Абушик, С. М. Антонов. Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, dsibarov@gmail.com

В нейронах натрий-кальциевый обменник плазматической мембраны (NCX) выполняет ключевую роль в поддержании кальциевого гомеостаза. Падение градиента натрия при эксайтотоксическом стрессе, вызванное ишемией или инсультом, может переводить NCX в обратный режим работы, приводя к усилению кальциевой перегрузки нейронов. Соединение KB-R7943 может усиливать выживаемость нейронов при эксайтотоксическом стрессе, блокируя NCX. Считается также, что нейропротекторный эффект KB-R7943 связан с ингибированием NMDA-рецепторов (NMDAR), высокая кальциевая проницаемость которых во многом определяет первичную кальциевую дисрегуляцию нейронов при эксайтотоксическом стрессе. Кроме того, возрастание концентрации внутриклеточного кальция вызывает кальциевую десенситизацию (инактивацию) NMDAR. В настоящем исследовании на первичной культуре нейронов коры головного мозга крыс методом patch-clamp — регистрации трансмембранных токов в конфигурации «целая клетка» — исследовано влияние

ингибирования NCX на процесс кальциевой инактивации NMDAR. Нами показано, что KB-R7943 является эффективным агонистом глицинового сайта NMDAR (1.18 ± 0.16 мкМ) и сам по себе не вызывает ингибирования токов NMDAR в отсутствие внеклеточного кальция. В присутствии 1 мМ внеклеточного кальция токи NMDAR, вызванные NMDA и глицином, демонстрируют десенситизацию до $\approx 50\%$ от пикового значения. Воздействие 10 мМ KB-R7943 уменьшает амплитуду токов NMDAR до $\approx 5\text{—}10\%$ от пикового значения. Этот эффект ранее воспринимался как прямое ингибирование NMDAR со стороны KB-R7943. Тем не менее в бескальциевом растворе KB-R7943 не вызывает ингибирования токов NMDA, а на нейронах, загруженных кальциевым хелатором BAPTA, даже в присутствии внеклеточного кальция не регистрируется кальцийзависимая инактивация NMDAR или подавление амплитуды токов при действии KB-R7943. Мы полагаем, что в наших экспериментах KB-R7943 ингибирует NCX, что затрудняет удаление кальция из примембранной зоны и усиливает десенситизацию NMDAR кальцием, входящим через эти рецепторы. Для ингибирования работы всех натрий-зависимых обменников, включая NCX, также может использоваться литий, обладающий одинаковой с натрием проницаемостью через каналы ионотропных рецепторов глутамата, но плохо транспортируемый обменниками. Литий в бескальциевом растворе не вызывает уменьшения токов NMDAR, вызванных аппликацией NMDA и глицина. Тем не менее в присутствии внеклеточного кальция эпизодическая замена натрия на литий достоверно на $60 \pm 8\%$ подавляет токи, вызываемые NMDA. Мы считаем, что при активации NMDAR в постсинаптическое пространство входит кальций, который вызывает кальцийзависимую десенситизацию NMDAR, но быстро удаляется из клетки NCX. Подавление NCX при помощи специфического блокатора (KB-R7943) или неспецифического блокатора (литий) препятствует удалению кальция из примембранной цитоплазмы, приводя к накоплению кальция и усиливая десенситизацию NMDAR. Таким образом, нами выявлена тесная функциональная связь между NCX и NMDAR, в которой работа NCX в прямом режиме ограничивает кальцийзависимую десенситизацию NMDAR.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 15-04-08283, 14-04-00227 и 14-04-31707).

ВЛИЯНИЕ СЕРОВОДОРОДА НА КАЛИЕВЫЕ КАНАЛЫ, МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ И ЭКЗОЦИТОЗ СЕКРЕТОРНЫХ ГРАНУЛ В GНЗ-КЛЕТКАХ ГИПОФИЗА КРЫСЫ. © Г. Ф. Ситдикова, А. В. Яковлев. Кафедра физиологии человека и животных, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет.

Сероводород (H_2S) является членом семейства газомедиаторов, участвующих в регуляции ряда физиологических и патофизиологических процессов. В возбудимых клетках эффекты H_2S опосредуются влиянием на активность ионных каналов, что в свою очередь определяет мембранный потенциал, способность к генерации потенциалов действия и как следствие — освобождение медиаторов и гормонов. Целью исследования было оценить влияние донора сероводорода — гидросульфида натрия

(NaHS) — на активность кальцийактивируемых калиевых (BK) каналов, мембранный потенциал и экзоцитоз секреторных гранул в гипофизарных опухолевых GH3-клетках крысы с использованием электрофизиологического и флуоресцентного подходов. Эксперименты проводили на культуре гипофизарных клеток крысы GH3, полученных из коллекции микроорганизмов и клеточных культур ФРГ. Мембранный потенциал и интегральные ионные токи регистрировали в конфигурации whole-cell в режимах отведения current-clamp и voltage-clamp соответственно, активность BK-каналов регистрировали в конфигурации outside-out с использованием усилителя Axopatch-200B, Digidata 1440A и программного обеспечения Clamp10 (Axon Instruments/Molecular Devices, Sunnyvale, California, США). Для анализа процесса экзоцитоза секреторных гранул использовали флуоресцентный маркер FM 1-43, с помощью которого окрашивали мембраны клеток в контрольных условиях и в ответ на деполяризацию — с помощью раствора, содержащего высокую концентрацию KCl (100 мМ). Флуоресцентные изображения клеток регистрировали с использованием микроскопа AxioScope A1 и высокоскоростной камеры AxioCam MRm (Carl Zeiss, Германия) и анализировали с помощью программы ImageJ software (NIH, США). Все используемые реактивы получены из фирмы Sigma (Vienna, Австрия). В результате наших исследований было показано, что NaHS вызывает увеличение выходящих интегральных калиевых токов, независимое от содержания внутриклеточного кальция и активации потенциалзависимых кальциевых каналов. Регистрация активности одиночных ионных каналов показала, что NaHS дозозависимо повышает вероятность открытия BK-каналов и этот эффект связан с восстанавливающим действием на белковые субъединицы канала. Кроме того, аппликация NaHS приводила к дозозависимой гиперполяризации мембраны клеток, прекращению спонтанной электрической активности и снижению сопротивления мембраны, что указывает на увеличение мембранной проводимости. С использованием блокатора и активатора АТФ-зависимых калиевых ($K_{\text{АТФ}}$) каналов было показано, что гиперполяризующий эффект NaHS связан с активацией $K_{\text{АТФ}}$ -каналов. Данное предположение было подтверждено в экспериментах с фиксацией потенциала, в которых регистрировали входящие токи в ответ на гиперполяризующие токи. NaHS вызывал увеличение амплитуды токов, и последующее добавление глибенкламида, блокатора $K_{\text{АТФ}}$ -каналов, снижало токи до контрольного уровня. С использованием флуоресцентного маркера FM 1-43 было показано повышение свечения мембраны клеток как в контрольных условиях, так и в ответ на деполяризацию, что отражает базальный и вызванный экзоцитоз секреторных гранул. Предварительное выдерживание клеток в растворе с NaHS снижало как базальный, так и вызванный экзоцитоз. Сделано заключение о том, что H_2S вызывает гиперполяризацию GH3-клеток, и это вызывает прекращение спонтанной электрической активности и снижение высвобождения гормонов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-15-00618).

ВЛИЯНИЕ ОДИНОЧНОЙ МУТАЦИИ F288S НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ИОНОТРОПНОГО ПУРИНОРЕЦЕПТОРА P2X7. © А. Скоринкин,¹⁻³ Н. Новосолова,³

Е. Ищенко,³ К. Хафизов,⁴ Ж. Барт,³ Д. Фаюк,³ Р. Гиниятуллин.^{1,3} ¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, askorink@yandex.ru, ²Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, ³Институт им. А. И. Виртанена университета Восточной Финляндии, Куопио, и ⁴Московский институт физики и технологии, Долгопрудный.

Ионотропные рецепторы P2X представляют собой семейство АТФ-управляемых ионных каналов, играющих важную роль во многих физиологических процессах. Все семь подтипов рецепторов P2X1-7 состоят из сходных, хотя и несколько различающихся последовательностей аминокислот; при этом скорости активации, инактивации и десенситизации этих рецепторов весьма различны, как и их сродство к агонисту (North, 2002). Пять наиболее часто встречающихся подтипов ионотропных рецепторов P2X1-5 содержат на позиции 275 консервативную аминокислоту серин (S275). Недавно нам удалось показать важную роль этой аминокислоты в обеспечении высокой скорости взаимодействия рецептора P2X3 с АТФ и высокой скорости его десенситизации (Petrenko et al., 2011). Обнаруженный преимущественно в иммунных и глиальных клетках рецептор P2X7 содержит на позиции 288, соответствующей позиции 275 у первых пяти подтипов ионотропных пуриноцепторов, аминокислоту фенилаланин (F288). При этом рецептор P2X7 обладает уникальным свойством — при длительной его активации высокой концентрацией агониста (≥ 1 мМ для АТФ) обычный катионный канал увеличивается в размере и переходит в так называемое состояние поры, способной пропускать не только ионы, но и небольшие органические молекулы, в частности АТФ (North, 2002). Предполагается, что это свойство рецепторов P2X7 может играть важную роль в нейроглиальном и глияглиальном взаимодействии. Используя технику patch-clamp и быструю аппликацию агониста, мы измерили трансмембранные токи, вызываемые АТФ, в клетках НЕК293 с экспрессированными в них либо нативными рецепторами P2X7, либо мутантными рецепторами, в которых находящийся на позиции 288 фенилаланин был заменен на серин (F288S). Предполагалось, что такое «восстановление» серина сделает мутантный рецептор P2X7 подобным по свойствам какому-либо из P2X1-5. Действительно, эксперименты показали, что 20-секундная аппликация 1 мМ АТФ, вызывающая из-за открытия поры генерацию огромного вторичного пика тока в нативном рецепторе P2X7, не генерирует вторичного пика в мутанте F288S. Однако 20-секундная аппликация 5 мМ АТФ все же вызывает открытие поры в мутанте, хотя и менее выраженное, чем в нативном P2X7. Кроме того, мутация F288S приводит к значительному замедлению инактивации открытых ионных каналов во всех случаях, когда пора не открывается. Кинетическое моделирование показало, что наблюдаемые феномены могут быть объяснены замедлением взаимодействия мутантного рецептора с агонистом, а также его более медленным переходом как в десенситизацию, так и в состояние поры. Следовательно, в нативном рецепторе P2X7 именно фенилаланин F288 обеспечивает высокую скорость этих взаимодействий и переходов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-00790а).

Список литературы

North R. A. 2002. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* 82 : 1013—1067.

Petrenko N., Khafizov K., Tvrdonova V., Skorinkin A., Giniatullin R. 2011. Role of the ectodomain serine 275 in shaping the binding pocket of the ATP-gated P2X3 receptor. *Biochemistry.* 50 : 8427—8436.

ОТВЕТ ПЕРВИЧНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА НА ЭКРАНИРОВАНИЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ ЗЕМЛИ. © И. М. Спивак,^{1–3} М. Л. Куранова,¹ Б. Ф. Щеголев,⁴ С. В. Сурма,⁴ В. Е. Стефанов.^{2, 1} Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, irina_spivak@hotmail.com, ² С.-Петербургский государственный университет, ³ С.-Петербургский государственный политехнический университет, и ⁴ Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург.

Необходимость исследования влияния слабых низкочастотных электромагнитных полей на биологические объекты различной степени сложности, в первую очередь на человека, обусловлена большой проникающей способностью этих полей в живые ткани. Отдельный интерес представляет выяснение роли клеточной пластичности в адаптации организма к внешним воздействиям, а именно исследование механизмов реакции клеток на экранирование магнитного поля Земли. В качестве моделей изучения влияния экранирования на живые объекты были выбраны клетки семей больных атаксией-телеангиэктазией (АТ). Атаксия-телеангиэктазия (синдром Луи-Бар) является сложным наследственным нейродегенеративным синдромом, характеризующимся генетической нестабильностью, повышенным риском опухолеобразования и прогероидными чертами, а также симптомами преждевременного старения. Для выяснения роли клеточной пластичности в адаптации организма к внешним воздействиям на клеточной модели клетки АТ было предпринято исследование, позволившее определить, участвует ли АТМ-зависимый ответ на повреждение ДНК в реакции клеток на экранирование магнитного поля Земли (ЭМПЗ). В работе было изучено состояние штаммов диплоидных фибробластов здорового донора и диплоидных фибробластов, полученных от больной АТ, помещенных в специально сконструированную экранирующую камеру. Для исследования клеточного ответа на измененные условия существования (ЭМПЗ) методом непрямой иммунофлуоресценции были исследованы белки P53, 53BP1 и P21. Клетки здорового донора в условиях ЭМПЗ демонстрировали картину, подобную той, которая возникает при повреждении ДНК (DDR response), т. е. повышалось количество белков P53 и P21, формировались фокусы 53BP1. В первичных фибробластах больных АТ никаких видимых изменений обнаружено не было. Кроме того, ранее нами было показано, что реакция митохондриальной сети на ЭМПЗ в клетках больных АТ задерживается на значительный промежуток времени. Полученные данные свидетельствуют о возможной роли АТМ-зависимого сигнального пути в ответе клетки на изменение ЭМПЗ.

СУБЪЕДИНИЧНЫЙ СОСТАВ NMDA-РЕЦЕПТОРОВ В КУЛЬТУРЕ МОЗЖЕЧКА КРЫС. © Ю. Д. Степаненко, Т. В. Карелина, П. А. Абушик, С. М. Антонов, Д. А. Сибаров.

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, moorl@rambler.ru

Известно, что рецепторы глутамата NMDA-типа (NMDAR) вовлечены в различные виды нейродегенеративных заболеваний и связаны с процессами синаптической пластичности. NMDAR различного субъединичного состава различаются по проводимости ионных каналов для Ca^{2+} , что может иметь значение для генерации Ca^{2+} -ответа нейронов. Целью данного исследования являлось определение субъединичного состава NMDAR и изменения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в ответ на действие различных агонистов рецепторов глутамата NMDA-типа в культуре нейронов мозжечка крыс на DIV 7. Для решения этой задачи использовали три метода — иммуноцитохимическое окрашивание субъединиц NMDAR, регистрация трансмембранных токов с помощью локальной фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка» и мониторинг внутриклеточной концентрации Ca^{2+} с помощью флуориметрического зонда Fluo3. Результаты иммуноцитохимического исследования показали, что практически все тела клеток культуры мозжечка на DIV 7 экспрессируют все субъединицы NMDAR. Субъединицу GluN2A экспрессирует 94.9 ± 2.0 % клеток, GluN2B — 97.3 ± 2.7 и GluN2C — 98.1 ± 1.2 %. Для активации NMDAR были использованы следующие агонисты: глутамат и гомоцистеин, являющийся эндогенным метаболитом, и NMDA — избирательный агонист NMDAR. В экспериментах по измерению внутриклеточных Ca^{2+} -ответов на кратковременную (2 мин) аппликацию гомоцистеина, NMDA и глутамата выявили три группы клеток. К первой группе были отнесены клетки, которые отвечали подъемом внутриклеточной концентрации Ca^{2+} на подачу всех агонистов. Их доля составила 59.9 ± 12.8 % от общего числа клеток. Клетки второй группы (34.2 ± 13.3 %) отвечали увеличением интенсивности флуоресценции NMDA и глутамата, что отражает увеличение свободной концентрации Ca^{2+} внутри клетки, но не реагировали на гомоцистеин. В клетках третьей группы (5.8 ± 2.2 %) Ca^{2+} -ответы на аппликацию NMDA не регистрировались, наблюдался резкий рост внутриклеточного $[Ca^{2+}]$ в ответ на глутамат. По-видимому, эти результаты указывают на избирательность действия гомоцистеина в отношении NMDAR определенного субъединичного состава и о присутствии в части клеток Ca^{2+} -проницаемых AMPA-рецепторов при отсутствии NMDAR. Для определения вклада каждой субъединицы в трансмембранные токи, опосредованные активацией NMDAR, использовали блокаторы, специфичные к GluN2C/GluN2D- и GluN2B-субъединицам, — QNZ46 и ифенпродил соответственно. Ток, вызываемый NMDA в нейронах, QNZ46 блокировал на 42 ± 14 , а ифенпродил — на 47 ± 10 %. Совместная аппликация QNZ46 и ифенпродила сопровождалась блокированием NMDAR-опосредованных токов на 74 ± 9 %, что меньше их суммарного эффекта. Это позволяет предположить существование как дигетеромерных, так и тригетеромерных рецепторов в культуре. Полученные данные демонстрируют, что практически все нейроны мозжечка на DIV 7 экспрессируют NMDAR. При этом часть нейронов не имеет NMDAR, но экспрессирует Ca^{2+} -проницаемые AMPA-рецепторы. Экспрессируемые NMDA-рецепторы включают в себя GluN2A-, GluN2B-, GluN2C- или GluN2D-субъединицы и могут являться как дигетеромерами, так и тригетеромерами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 15-04-08283, 14-04-00227 и 14-04-31707).

ВНУТРИЦЕНТРАЛЬНАЯ МИГРАЦИЯ МЕЗЕНХИМНЫХ КЛЕТОК ПОСЛЕ ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ КРЫСАМ Ю. © П. Стукач. Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, stukachulya@gmail.com

Проблема коррекции тяжелых состояний, вызванных повреждением тканей головного мозга (травма, нейрохирургические операции), в современной медицине до сих пор не решена, поэтому актуальной является разработка технологий, направленных на активацию репаративных процессов в центральной нервной системе. Сегодня к наиболее перспективным методикам относится введение стволовых клеток внутривенно или в поврежденный участок головного мозга. Однако у этих технологий есть ряд существенных недостатков: в первом случае — диффузное распределение стволовых клеток в кровотоке и слабая проницаемость гематоэнцефалического барьера, во втором — дополнительная травматизация пациента. Для нивелирования недостатков этих методик разработана методика, основанная на гипотезе о реальности миграции стволовых клеток в мозг через рецептивные окончания черепно-мозговых нервов. В связи с этим в работе поставлена цель — верифицировать в экспериментах на крысах особенности миграции мезенхимных клеток в головной мозг после их введения под слизистую оболочку носа. Мезенхимные клетки выделяли из жировой ткани взрослых крыс и культивировали в полной питательной среде DMEM (Sigma, Германия) на протяжении 5 сут. В день проведения операции клетки окрашивали флуоресцентным красителем PKH67 Green Fluorescent Cell Linker (Sigma, Германия). Операции по разрушению участков головного мозга проводили на крысах под наркозом. Животных фиксировали в стереотаксисе, подготавливали трепанационное отверстие (2.5 мм латеральнее средней линии, на 2.5 мм каудальнее брегмы и на 5.0 мм в глубину от поверхности мозга), через которое удаляли ткань мозга размером 2 × 2 мм. Спустя 10 мин под слизистую оболочку носа вводили 50 мкл клеточной суспензии (35 тыс. клеток). Продольные срезы мозга (толщина 8 мкм) получали на криостате через 1 и 24 ч, а также через 10 сут после введения клеток. Препараты анализировали на конфокальном микроскопе (Zeiss AxioVert 200M inverted research, камера: Zeiss AxioCam HRm, объектив: Plan-Neofluar 40×/0.75, Plan-Neofluar 20×/0.5 или Plan-Neofluar 10×/0.3) при увеличениях 10, 20, 40.

В результате экспериментов установлено, что через 1 ч мезенхимные клетки активно проникают в обонятельные луковицы, отдельные клетки обнаружены в лобных долях, скорлупе, гиппокампе и области травмы. При исследовании образцов, полученных через 24 ч, флуоресцирующие элементы визуализировались в довольно большом количестве в обонятельных луковицах и лобных долях как левого, так и правого полушария, а также в области травмы. Через 10 сут после имплантации мезенхимных клеток флуоресцирующие элементы в большом количестве зарегистрированы в области травмы при их отсутствии в других отделах головного мозга крыс, при этом существенным является образование клеточных скоплений в области повреждения. Таким образом, полу-

ченные данные свидетельствуют о наличии периневрального трейсинга мезенхимных клеток, причем основной вектор их миграции в мозге направлен к поврежденному участку.

ПОИСК МОЛЕКУЛЯРНЫХ КОРРЕЛЯТОВ АКТИНУПРАВЛЯЕМЫХ КАНАЛОВ В КЛЕТКАХ ЛЕЙКЕМИИ ЧЕЛОВЕКА. © А. В. Сударикова, И. О. Васильева, Е. А. Морачевская, В. И. Чубинский-Надеждин. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, anastasia.sudarikova@gmail.com

Реорганизация актинового цитоскелета может играть доминантную роль в регуляции потенциалнезависимых ионных каналов в плазматической мембране электроневозбудимых клеток. В различных клетках млекопитающих, в том числе клетках крови, найдены натрий-селективные каналы, активность которых критически зависит от состояния микрофиламентов. Ранее показана и детально изучена функциональная связь натриевых каналов с динамикой примембранного актина в клетках лейкемии человека. В то же время до сих пор неизвестна молекулярная природа потенциалнезависимых натриевых каналов, которые на основании известного механизма активации и инактивации могут быть названы актинуправляемыми. Наши предварительные результаты позволяют предположить, что это амилорид-нечувствительные каналы ENaC; в качестве рабочей гипотезы могут рассматриваться также каналы подсемейства TRPM, в частности TRPM4 и M5. Задачи работы включают в себя: а) определение и уточнение возможных молекулярных коррелятов на основании биофизических характеристик одиночных каналов в клетках лейкемии человека K562 и лимфомы U937; б) получение профиля экспрессии возможных кандидатов на уровне мРНК и белка с учетом вариантов субъединичного состава. Суммируя результаты экспериментов патч-кламп, можно заключить, что актинуправляемые каналы имеют проводимость 10—12 пСм (145 мМ Na⁺), характеризуются натриевой селективностью (отношение проницаемостей P_{Na}/P_K около 3), непроницаемы для двухвалентных катионов (Ca²⁺ и Mg²⁺) и не блокируются амилоридом. В опытах на клетках U937 и K562 показано отсутствие амилорид-чувствительной компоненты как на уровне одиночных каналов, так и на уровне интегрального натриевого тока. Судя по имеющимся данным, активность исследуемых каналов, вероятно, не зависит от уровня свободного ионизированного кальция в цитозоле. Таким образом, проведенные электрофизиологические тесты не дают аргументов в пользу TRPM как возможных прототипов потенциалнезависимых натриевых каналов. Методом ОТ-ПЦР показана экспрессия альфа-, бета-, гамма-hENaC в клетках K562 и U937. Однако очевидны отличия функциональных характеристик исследуемых актинуправляемых каналов от типичных каналов ENaC почки. Становится понятно, что чувствительность к амилориду и его производным является недостаточным критерием в идентификации каналов ENaC как в транспортных эпителиях, так и в других типах клеток. Проблема идентификации осложняется также тем, что амилорид-нечувствительные каналы семейства ENaC изучены пока недостаточно. В перспективе определение молекулярной природы актинуправляемых каналов может способствовать выяснению цитоскелетзависимых механизмов контроля активности натриевых каналов в апикаль-

ных мембранах почечного эпителия, регулирующих водно-солевой баланс на уровне организма.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 15-04-02950 и 15-34-20464).

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МЕЖДУ ТРАНСПЛАНТАМИ ФЕТАЛЬНОГО НЕОКОРТЕКСА И ТКАНЬЮ МОЗГА ВЗРОСЛОГО РЕЦИПИЕНТА. © К. К. Сухинич,^{1,2} М. А. Александрова.¹ ¹ Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, transpl@hotmail.com, и ² Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича РАН, Москва.

Малодифференцированные нейральные клетки обладают способностью интегрироваться и стимулировать репаративные процессы при трансплантации в мозг взрослого реципиента, несмотря на блокирующее аксональный рост микроокружение последнего. Исследование дифференцировки клеток в новом микроокружении имеет фундаментальное значение и важно для регенеративной медицины. Интеграция клеток зависит от стадии их дифференцировки и методов пересадки. Целью работы был иммуногистохимический анализ структурной и цитоскелетной дифференцировки клеток от тканевых и суспензионных аллогенных трансплантатов фетального неокортекса GFP-мышей разной стадии развития в ткани мозга взрослого реципиента. Донорским материалом послужили суспензии клеток или фрагменты неокортекса эмбрионов трансгенных GFP мышей (Okabe, 1997) на стадиях развития Э-12.5, Э-14.5 и Э-19.5. Клетки трансплантировали (из расчета 500 тыс. клеток в 1.5 мкл раствора Хэнкса на мыш) по координатам от брегмы +0.45 мм, латерально 2 мм, на глубину 2.5 мм в мозг взрослым мышам. Иммуногистохимическое исследование проводили с помощью следующей панели антител: anti-GFP (маркер клеток донора), anti-GFAP (маркер глиальных клеток), anti-NeuN (маркер зрелых нейронов), anti-Ki67 (маркер пролиферирующих клеток), anti-DCX (маркер незрелых нейронов), anti-TH (маркер тирозингидроксилазных клеток и волокон). Для получения микрофотографий использовали флуоресцентный микроскоп Keyence BZ-9000E и лазерный сканирующий конфокальный микроскопа Leica TCS SP5. Результаты показали, что микроокружение взрослого мозга не ингибирует развитие клеток фетальной ткани как ранних, так и поздних сроков развития. Было обнаружено ускорение дифференцировки клеток трансплантатов в астроциты (по экспрессии GFAP) и торможение дифференцировки в нейрональном направлении. Антитела к GFP (под актиновым промотором) четко выявляли структуру дифференцирующихся клеток, растущие волокна и образование шипиков на дендритах. На 30-е сут после пересадки выявлялись клетки с морфологией как астроцитов, так и нейронов. Клетки от Э-12 активно мигрировали по волоконным трактам стриатума, вдоль сосудов реципиента, под оболочками мозга и по первому слою коры реципиента. Активная миграция характерна и для начального периода нейрогенеза при нормальном развитии. Пересаженные клетки от эмбрионов разных стадий развития были способны формировать обширные сети тонких аксонов. Они образовывали плотную сеть в стриатуме, распространялись до ростральных

областей фронтальной коры, а единичные проникали в internal capsule. Можно полагать, что на фетальных клетках отсутствуют рецепторы к блокаторам аксонального роста взрослого мозга. Клетки, трансплантированные в виде суспензии, обладали более низкими потенциями к росту отростков, чем клетки от цельных фрагментов ткани, что, вероятно, связано с повреждением клеточной мембраны при диссоциации клеток. Нервные волокна от клеток реципиента проникали в трансплантат. Таким образом, трансплантированные клетки фетальной ткани дифференцировались и распространяли обширные сети аксонов в зрелой ткани мозга реципиента. Микроокружение взрослого мозга, которое принято считать ингибирующим, поддерживало перестройки цитоскелета клеток трансплантатов, необходимые для дифференцировки и роста аксонов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-31117).

РОЛЬ МИКРОТРУБОЧЕК И МИОЗИНА В РАСПЛАСТЫВАНИИ ФИБРОБЛАСТОВ. © А. В. Творогова,¹ Т. А. Смирнова,² А. А. Гладких,² И. А. Воробьев.^{1,2} ¹ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, ² Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, yogurtovskaya@mail.ru

В работе была исследована зависимость кинетики распластывания клеток Vero от микротрубочек (MT), их динамической нестабильности и актомиозинового сокращения. В качестве ингибиторов актомиозинового сокращения использовали блеббистатин и Y27632. Ингибиторами MT служили высокие дозы нокодазола или сочетание наномолярных доз нокодазола и таксола (для подавления динамической нестабильности MT). Клетки начинали распластывание асинхронно, в среднем через 7.2 ± 3.5 мин после прикрепления клетки к субстрату. Кинетика распластывания каждой клетки нелинейна, увеличение площади в первые 10 мин составляет 72.69 ± 10.01 мкм²/мин, на отрезке 10—60 мин — 9.30 ± 1.43 мкм²/мин. За это время клетки увеличивают относительную площадь в 6.64 ± 0.35 раза, и 2/3 увеличения площади приходится на первые 10 мин. Начальное распластывание клеток в присутствии ингибиторов миозина в целом похоже на распластывание в норме. Период от прикрепления клетки до начала распластывания составляет 7.5 ± 4.5 (блеббистатин) и 10.5 ± 4.2 (Y27632) мин. Кинетика распластывания остается нелинейной: в первые 10 мин клетки распластываются со скоростью 51.87 ± 6.52 (блеббистатин) и 39.04 ± 4.94 (Y27632) мкм²/мин. На отрезке 10—60 мин скорость распластывания падает до 9.60 ± 1.73 мкм²/мин для блеббистатина и 9.53 ± 0.91 для Y27632. Относительная площадь клеток к концу 1-го ч достигает значений, близких к норме. Деполимеризация MT или подавление их динамической нестабильности приводит к увеличению времени от прикрепления клетки до начала распластывания и к значительному уменьшению скорости начального распластывания. Период ожидания составляет 32 ± 25 мин при стабилизации MT и может достигать 6 ч при полной деполимеризации MT (среднее время 80 ± 113 мин). В таких клетках в течение

первых 10 мин скорость распластывания в среднем в 5 раз ниже нормы в условиях стабилизации МТ и в 10 раз ниже нормы при полной разборке МТ. В дальнейшем скорость распластывания продолжает снижаться и на отрезке 10—60 мин составляет 4.64 ± 0.82 мкм²/мин в условиях стабилизации и 2.35 ± 0.43 в условиях разборки МТ. К концу 1-го ч клетки достигают площади 1/3—2/3 от нормальных значений. При ингибировании миозина в клетках, распластывающихся в условиях стабилизации МТ, сохраняется задержка начала распластывания, характерная для клеток со стабилизированными МТ. Скорость распластывания в первые 10 мин составляет 56.54 ± 7.62 мкм²/мин для блеббистатина и 30.84 ± 4.95 для Y27362, что соответствует значениям для клеток, обработанных только ингибиторами миозина. К концу часа относительная площадь клеток достигает 5.53 ± 0.33 и 5.23 ± 0.33 . Ингибирование миозина в клетках, распластывающихся в условиях полной разборки МТ, уменьшает задержку начала распластывания до 54.75 ± 37.5 мин (блеббистатин) и 28.27 ± 19.13 (Y27362) и восстанавливает значения скорости на 10 мин, близкие к значениям для клеток, обработанных только ингибиторами миозина. Через 60 мин относительная площадь клеток увеличивается в 4.48 ± 0.30 и 4.57 ± 0.40 раза (блеббистатин и Y27362 соответственно). Таким образом, распластывание клеток состоит из нескольких этапов, и начальные этапы распластывания клеток *Vevo* зависят от наличия динамичных МТ и практически не регулируются миозином.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 3-04-40189-Н).

ДОЗОЗАВИСИМЫЕ ЭФФЕКТЫ ИНГИБИТОРОВ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ МИКРОТРУБОЧЕК. © А. В. Творогова,¹ Т. А. Смирнова,² А. А. Гладких,² Л. Ш. Измайлова,² И. А. Воробьев.^{1,2} ¹ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова и ² Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, ivorobjev@mail.ru

Микротрубочки (МТ) играют важную роль в процессах организации формы клетки. Ингибиторы, влияющие на динамическую нестабильность МТ, затрудняют клеточную подвижность и блокируют клеточное деление. В данной работе проведена количественная оценка параметров роста плюс-концов МТ под действием антимиотрубочковых ядов — нокодазола, таксола и винорельбина. В эксперименте анализировали фибробласты линии 3Т3, трансфицированные EB3-RFP, до воздействия ингибиторов и те же клетки через 1 ч после воздействия (5—8 клеток в группе). Длины треков плюс-концевых комплексов («комет») измеряли по изображению максимальной интенсивности за 100 с. В клетках 3Т3 средняя длина треков была значительно меньше радиуса клетки. Большинство треков подходит к краю, их длина составила 5.02 ± 0.16 мкм (N = 389), в околоядерной области треки слегка длиннее — 5.79 ± 0.19 мкм (N = 335). Наиболее длинные треки располагаются центробежно вдоль длинной оси клетки в ламелле, но при воздействии ингибиторов МТ в концентрации выше пороговой эта популяция треков не выявляется. Добавление винорельбина в кон-

центрациях 1 и 5 нМ не оказало видимого эффекта на распределение и длину треков, но в концентрации 10 нМ винорельбин несколько уменьшает число и длину комет, протяженные треки не выявляются. EB3 в этих условиях частично сохраняет связь с протяженными участками МТ или образует малоподвижные округлые агрегации диаметром немного меньше 1 мкм. В винорельбине (100 нМ или 1 мкМ) треки комет не прослеживаются, число агрегаций растет. Нокодазол в концентрации 10 нМ не оказывает видимого влияния на МТ, а в концентрации 100 нМ вызывает уменьшение плотности треков на краю клетки и в околоядерной области, их длина уменьшается в 1.5—2 раза. Увеличение концентрации до 800 нМ приводит к резкому уменьшению плотности и длины треков, количества и длины комет, появлению агрегации EB3, которые равномерно распределяются по цитоплазме. В отличие от двух других ингибиторов действие таксола в концентрациях 100 и 800 нМ приводило не к уменьшению числа треков, а только к их перераспределению: в центральной части клетки плотность треков уменьшалась, а на краю ламеллы увеличивалась. Треки укорачиваются в обеих дозах примерно в 1.5 раза. Длина комет также уменьшилась в обеих группах. Таким образом, винорельбин эффективно подавляет динамику МТ, пороговая концентрация этого цитостатика составляет около 10 нМ, нокодазол действует сходным образом, но менее эффективно, чем винорельбин, а таксол даже в концентрации 800 нМ, которая значительно превышает митостатическую, не стабилизирует МТ полностью. Предложенный метод оценки воздействия ингибиторов показывает высокую сходимость измеряемых значений длин треков между отдельными клетками и позволяет количественно оценивать степень эффекта низких доз ингибиторов на динамику МТ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-40189-Н).

АКТИВАЦИЯ ЕрСАМ-СИГНАЛЬНОГО ПУТИ В КЛЕТКАХ МОНОСЛОЙНЫХ КУЛЬТУР КРЫСИНОЙ ГЕПАТОМЫ ЗАЙДЕЛА. © Н. П. Терюкова, Е. И. Сахенберг, В. А. Иванов, С. А. Снопов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Перевиваемая асцитная гепатома Зайдела была индуцирована у крыс более 50 лет назад с помощью гепатокарцерогена 4-диметиламиноазобензола (Зайдела, 1963). Мы предполагаем, что асцитная форма гепатомы является этапом метастатического каскада на пути диссеминации опухоли в организме и представляет собой адекватную модель для изучения механизмов опухолевой прогрессии и метастазирования. Ранее с помощью масс-спектрометрического анализа в составе наружных мембран клеток асцитной гепатомы Зайдела нами были выявлены и идентифицированы некоторые опухолеассоциированные антигены, в числе которых маркер стволовых/прогениторных клеток печени — адгезионная молекула эпителиальных клеток ЕрСАМ (Терюкова и др., 2010). Мембранный гликопротеид ЕрСАМ, имеющий мол. массу 32—42 кДа, состоит из эктодомена ЕрЕХ, трансмембранного домена и С-терминального эндодомена ЕрICD с мол. массой 6 кДа. В большинстве нормальных эпителиальных тканей функциональная роль ЕрСАМ

сводится только к межклеточной гомотипической адгезии. Однако в опухолях эпителиального происхождения в результате регулируемого внутримембранного протеолиза домен ЕpЕХ высвобождается в межклеточную среду, а домен ЕpICD — в цитоплазму, откуда в комплексе с FHL2, бета-катенином и Lef-1 перемещается в ядро и связывается с ДНК для непосредственного участия в регуляции транскрипции генов репрограммирующих факторов с-Myc, Oct4, Nanog и Sox2 (Munz et al., 2009; Huang et al., 2011; Lin et al., 2012). Последовательность событий, которая начинается с расщепления ЕpСAM, получила название ЕpСAM-сигнального пути. Известно, что синтез ЕpСAM осуществляется в нормальных низкодифференцированных клетках гепатоцитарного ряда — гепатобластах и овальных клетках — и прекращается в зрелых гепатоцитах (Schmelzer et al., 2006). В клетках гепатоцеллюлярных карцином экспрессия ЕpСAM регулируется активностью Wnt-beta-катенинового сигнального пути, непосредственной мишенью которого является ген ЕpСAM (Yamashita et al., 2007), однако клетки некоторых печеночноклеточных карцином, так же как почечноклеточных карцином, урогенитальных опухолей и плоскоклеточного рака кожи, оказываются ЕpСAM-негативными (Spizzo et al., 2011). Задачей нашего исследования было изучение экспрессии ЕpСAM в клетках монослойной линии гепатомы Зайдела и ее клонах — клеточных линиях с признаками опухолевых стволовых и прогениторных клеток. С помощью иммуноблотинга мы определили, что в лизатах всех клеток присутствовал компонент с мол. массой 32 кДа, связывающий поликлональные антитела к домену ЕpICD (A-20, Santa Cruz). Для выявления клеточной локализации ЕpICD мы выращивали клетки на покровных стеклах, фиксировали параформальдегидом и пермеабилizировали Тритоном X-100 или сапонином, после чего обрабатывали антителами к домену ЕpICD и вторичными антителами с флуоресцентной меткой. С помощью конфокальной микроскопии мы впервые зарегистрировали ядерную локализацию эндодомена ЕpСAM для клеток всех линий. Домен ЕpICD концентрировался кластерами вокруг ядрышковых зон, что, очевидно, отражает его участие в процессах транскрипции и поддержании низкодифференцированного статуса клеток. В клетках, находящихся в митозе, сходные по размеру кластеры ЕpICD определялись только вне хроматина в цитозоле. При проведении электрофореза клеточных лизатов короткие молекулы ЕpICD, по-видимому, мигрировали в низкомолекулярную часть геля, вследствие чего и не выявлялись на иммуноблоте. В следующей работе мы исследуем экспрессию ЕpСAM в клетках суспензионных культур, отличающихся от монослойных по способу роста, адгезивным свойствам, активности матриксных металлопротеаз и пролиферативной активности.

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ПЕРОКСИД ВОДОРОДА УСКОРЯЕТ ДВИЖЕНИЕ ФИБРОБЛАСТОВ ЗА СЧЕТ АСИММЕТРИЧНОЙ АКТИВАЦИИ PI3K/Akt И ПРОТРУЗИОННОЙ АКТИВНОСТИ ПЕРЕДНЕГО КРАЯ.

© П. А. Тюрин-Кузьмин,¹ Н. Д. Ждановская,¹ А. А. Сухова,¹ А. В. Воронников.^{1,2} ¹ Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, tyurinkuzmin.p@gmail.com, и ² Российский кардиологический научно-производственный комплекс Министерства здравоохранения РФ, Москва, a.vorotnikov@cardio.ru

Внутриклеточные градиенты сигнальных молекул задают направление и стимулируют миграцию клеток. Фосфатидилинозитолтрифосфат (PIP3), образуемый PI3-киназой, служит главной такой молекулой при хемотаксисе. Он маркирует передний край клетки, участвуя в активации ГТФазы Rac — ключевого активатора динамики актина в лидирующей ламелле. Однако все механизмы действия PIP3, так же как и другие регуляторы направленной миграции, до конца неизвестны. Пероксид водорода (H₂O₂) образуется в клетке НАДФН-зависимыми оксидазами NOX и двойными оксидазами DuOX, которые часто используют Rac как активатор. H₂O₂ действует локально и в низких концентрациях как вторичный посредник, кратковременно активируя тирозиновые киназы семейства Src и выключая тирозиновые фосфатазы. Так, H₂O₂ поддерживает активность тирозинкиназных сигнальных каскадов при активации клеточных рецепторов. Известно, что H₂O₂ каким-то образом участвует в хемотаксисе лейкоцитов и миграции фибробластов, но полностью механизм его действия не выяснен. Используя внутриклеточный сенсор H₂O₂, мы ранее обнаружили, что H₂O₂ накапливается в лидирующей ламелле мигрирующих 3T3-фибробластов и формирует внутриклеточные градиенты, зависящие от PIP3 и совпадающие с направлением движения. Нарушение градиентов H₂O₂ тормозило движение фибробластов, но ни влияние H₂O₂ на динамику субклеточных структур, ни мишени H₂O₂ определены не были. Чтобы ответить на эти вопросы, мы проанализировали динамику H₂O₂ и переднего края мигрирующих клеток и провели РНК-интерференцию NOX/DuOX для оценки PDGF-зависимого фосфорилирования PKB/Akt как репортера активности PI3-киназного модуля. Одновременный анализ распределения H₂O₂ и динамики переднего края проводили с помощью кимограмм свободно движущихся фибробластов, экспрессирующих сенсор к H₂O₂ HyPer, слитый к РН-домену киназы Btk (PIPSHOW). Мы обнаружили четкую корреляцию между примембранным уровнем H₂O₂ и скоростью роста протрузий. Выключение экспрессии DuOX2 с помощью si-RNA или обработка каталазой снижали внутриклеточные градиенты H₂O₂ и скорость движения клеток. Таким образом, именно H₂O₂, а не предшествующие ему активные формы кислорода увеличивает скорость движения клеток за счет ускорения роста лидирующих протрузий. Обработка si-RNA вела к снижению уровня мРНК и экспрессии DuOX2 в 3—4 раза. При этом PDGF терял способность стимулировать миграцию фибробластов и активировать фосфорилирование PKB/Akt — конечной мишени PI3-киназного каскада, чего не происходило при обработке клеток бессмысловой si-RNA. В совокупности наши результаты свидетельствуют о том, что H₂O₂ ускоряет движение фибробластов, активируя PI3-киназный каскад на переднем крае, динамику актина и протрузионную активность. Тот факт, что градиенты H₂O₂ зависят от градиентов PIP3, но не наоборот, указывает на то, что мишенью H₂O₂ является нижестоящий компонент PI3-киназного модуля или сама PKB/Akt.

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ РАСТВОРОВ АТР-G-AKТИНА И МЕСТА ПРОЧНОГО СВЯЗЫВАНИЯ ДИКАТИОНА МАГНИЯ (Mg²⁺). © В. Н. Умецкая. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Известно, что механизм полимеризации и регуляции полимеризации актина ответствен за природу динамики

цитоскелета. Изменение организации филамента F-актина вызывает изменение формы клеток. В настоящей работе рассмотрен механизм превращения АТР-G-актина в F-актин в Mg^{2+} -содержащих растворах, в частности роль гидролиза АТР, связанной в активном центре G-актина, в процессе образования филаментарного актина в этих условиях. Перечисленные вопросы к настоящему времени до конца не изучены. До конца неизвестно место присоединения дикаатионов металлов в АТР-G-актине, неясен механизм гидролиза АТР, а также порядок последовательности функций гидролиза и полимеризации в растворах актина и в клетке. Эти вопросы лежат в основе многих современных исследований. Нами показано с помощью УФ-спектров поглощения, что в результате взаимодействия с Mg^{2+} происходит гидролиз АТР, связанной с G-актином в его активном центре с образованием АТР-G-актина, что является начальным шагом перехода в F-актин. В данной работе с помощью спектров протонного ядерного магнитного резонанса (ЯМР) были изучены те же образцы АТР-G-актина, а также Mg^{2+} АТР-G-актина в D_2O для определения места прочного связывания дикатиона магния, условий гидролиза АТР и полимеризации актина. Было обнаружено, что Mg^{2+} образует комплекс с АТР и его окружением в белке. При этом создаются условия для гидролиза АТР в активном центре G-актина с образованием АТР-G-актина. С течением времени происходит накопление АТР-G-актина, который по достижении критической величины переходит в F-актин. Этот переход кооперативно зависит от времени. Выводы сделаны на основе рассмотрения химических сдвигов протонов в области аденинового кольца АТР. Обнаружены различия положения резонансов протонов при C_2 и C_8 аденина АТР в комплексе с G-актином в D_2O , смещение полос и расщепление полосы резонанса протона при C_8 на две полосы, свидетельствующие о существовании в растворе актина в двух формах Mg^{2+} АТР-G-актина и АТР-F-актина. Изменение положения сигналов протонного ЯМР-спектра аденина является доказательством близости как Mg^{2+} , так и PO_3 -групп трифосфатной связи, что в свою очередь доказывает нелинейность расположения PO_3 -групп трифосфатной цепи АТР при соответствующем угле гликозидной связи. Эта модель пространственного строения АТР была предложена ранее на основе рассмотрения спектров свободной АТР в растворе и подтверждена настоящим исследованием для структуры АТР в составе G-актина в его активном центре.

РЕГУЛЯЦИЯ ЛОКАЛИЗАЦИИ БЕЛКА ПЕРИЦЕНТРИОЛЯРНОГО МАТЕРИАЛА РСМ-1 КИНАЗОЙ LOSK. © А. И. Фокин,¹ Е. Н. Рябкова,¹ О. Н. Жанпарова,¹ Е. С. Надеждина.^{1,2} ¹ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, fktimofei@yandex.ru, и ² Институт белка РАН, Пушкино.

Серин-треониновая киназа LOSK (long Ste20-like kinase) является одним из ключевых регуляторов зарождения микротрубочек на центросоме во время интерфазы, что необходимо для их упорядоченного расположения. Это обеспечивается путем таргетирования динактинового комплекса на центросому через фосфорилирование его компонента — белка p150^{Glued}. Ингибирование активности LOSK приводит к потере динактином

его центросомного местоположения и хаотизации микротрубочек; в то же время имитирующий фосфорилирование p150^{Glued} способен поддерживать свою центросомную локализацию и радиальную систему микротрубочек в клетках.

Ингибирование активности LOSK также негативно сказывается и на локализации некоторых компонентов перичентриолярного материала. Мы показали, что белок РСМ-1, участвующий в образовании первичных ресничек и негативно влияющий на организацию микротрубочек центросомой, теряет свое нормальное местоположение и распределяется по цитоплазме клеток. Оказывается, что поддержание локализации РСМ-1 не зависит от местоположения динактина: в экспериментах по искусственному таргетированию p150^{Glued} на аппарат Гольджи или на центросому мы обнаружили соответствующее перераспределение компонентов динактинового комплекса, но не белка РСМ-1. Более того, синтез рекомбинантных белков p150^{Glued} сам по себе в большинстве случаев приводил к диспергированию РСМ-1 по цитоплазме клеток. Этот эффект, вероятно, был опосредован ингибированием активности динеинового транспорта за счет наличия в молекуле p150^{Glued} СС1-участка, негативно влияющим на транспортные функции динеина, а также нарушением естественной локализации белка p150^{Glued}, препятствующей ему выполнять транспортных функций в составе динактинового комплекса. Также мы установили, что ингибирование LOSK, во-первых, не затрагивает транспортных функций динеина (движение содержащих белок ERGIC53 везикул); во-вторых, нарушает внутриклеточный транспорт в долговременных событиях (сборка аппарата Гольджи при отмывке брэфелдина А). Кроме того, нарушение радиальной организации микротрубочек, не связанное с ингибированием динеинового транспорта (ингибирование активности протеинкиназы GSK-3 β), приводит к такому же эффекту потери белком РСМ-1 его центросомного местоположения, как и в случае ингибирования активности LOSK. Суммируя вышесказанное, можно заключить, что LOSK обеспечивает радиальную организацию микротрубочек, а та в свою очередь способствует эффективному транспорту компонентов перичентриолярного материала к центросоме.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 15-04-02609-а и 14-04-01729-а).

МЕХАНИЗМ ЗАДЕРЖКИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА В ФАЗЕ G₂ ПРИ ПОВЫШЕНИИ КОНЦЕНТРАЦИИ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ В ЦИТОЗОЛЕ У ДРОЖЖЕЙ *HANSENULA POLYMORPHA*. © А. В. Фокина, А. В. Каргинов, М. Д. Тер-Аванесян, М. О. Агафонов. Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Москва, a.fokina@gmail.com

Ca²⁺ участвует в передаче сигнала внутри клетки в качестве вторичного мессенджера. Чтобы осуществлять эту функцию, Ca²⁺ накапливается во внутриклеточных депо, а его концентрация в цитозоле поддерживается на очень низком уровне. У дрожжей основным депо Ca²⁺ является вакуоль. Существенную роль в поддержании низкой концентрации Ca²⁺ в цитозоле и его накоплении в вакуоли играет вакуолярная Ca²⁺-АТФаза Pmc1. Нарушение гена *PMC1* приводит к неспособности дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* расти в условиях высокой концентрации Ca²⁺ в

среде. Ранее нами было обнаружено, что у дрожжей *Hansenula polymorpha* нарушение этого гена помимо чувствительности к высокой концентрации Ca^{2+} приводит также к повышению чувствительности к додецилсульфату натрия (SDS) в среде. Нами были идентифицированы три гена, нарушение которых снижает чувствительность к SDS у мутанта с нарушенным геном *PMc1*. Одним из этих генов был *CCH1*, кодирующий субъединицу канала плазматической мембраны для Ca^{2+} , другим — *HOG1*, кодирующий протеинкиназу, обеспечивающую ответ клетки на гиперосмотический шок, а третьим — *WEE1*, кодирующий протеинкиназу, регулирующую переход клеточного цикла от фазы G_2 к митозу. Инактивация гена *PMc1* у штамма, который продуцировал химерный белок, содержащий N-концевой фрагмент Wee1, вызвала нарушение морфологии клеток, характерное для задержки клеточного цикла в фазе G_2 . Это могло быть связано с вытеснением полноразмерного белка Wee1 из взаимодействия с комплексом белков Hsl1 и Hsl7, которые стимулируют его деградацию. Эти данные также позволяли предполагать, что повышение концентрации Ca^{2+} в цитозоле при инактивации вакуолярной АТФазы *Pmc1* приводит к увеличению чувствительности к SDS в результате задержки клеточного цикла в фазе G_2 , которая связана с увеличением активности Wee1 и Hog1. Нами были проведены эксперименты, результаты которых подтверждали правильность выдвинутых предположений. В частности, было показано, что нарушение вакуолярной Ca^{2+} -АТФазы *Pmc1* приводит к увеличению количества фосфорилированной формы киназы Hog1. Было также обнаружено, что влияние экспрессии химерного белка, содержащего N-концевые домены Wee1, на морфологию клеток обнаруживается только при наличии аллели *WEE1* дикого типа.

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА ДЕПОЛИМЕРИЗАЦИИ МИКРОТРУБОЧЕК ПАКЛИТАКСЕЛА НА МОРФОГЕНЕЗ СТВОРКИ ДИАТОМОВОЙ ВОДОРΟΣЛИ *SYNEDRA ACUS* SUBSP. *RADIANS* KÜTZING. © К. В. Харитonenko, Е. Д. Бедошвили. Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, kani161089@rambler.ru

Главная особенность диатомовых водорослей — кремнистый панцирь, который синтезируется внутри клетки и состоит из двух перекрывающихся частей: эпитеки и гипотеки. При использовании различных цитоскелетных ингибиторов были выявлены многочисленные отклонения в развитии кремнистых створок, установлена локализация микротрубочек и актинового цитоскелета при морфогенезе створок нескольких видов морских диатомей (Cohn et al., 1989; Van de Meene, Pickett-Heaps, 2002, 2004; Tesson, Hildebrand, 2010). В исследовании морфогенеза пресноводной диатомовой водоросли *Synedra acus* subsp. *radians* Kützing нами были установлены последовательность и продолжительность стадий морфогенеза створки в синхронизированной культуре, а также было показано, что добавление колхицина — ингибитора полимеризации тубулина — на определенных стадиях морфогенеза вызывает характерные для каждой стадии аномалии развития створок (Kharitonenko et al., 2014). Целью данной работы было определить влияние паклитаксела — ингибитора деполимеризации тубулина — на формирование кремнистых створок *S. acus* subsp. *radians* в синхронизированной культуре. Синхронизацию культу-

ры проводили методом кремниевого голодания в темноте в течение 3 сут. После окончания синхронизации в культуральную среду добавляли метасиликат натрия, чтобы клетки начали формирование створки. Паклитаксел был добавлен в среду через 0.5, 1.5, 2.5 и 3.5 ч после добавления в среду кремния. Через 0.5 ч после добавления паклитаксела клетки отмывали чистой средой и выращивали в течение 1 сут, после чего фиксировали этанолом. Методом трансмиссионной электронной микроскопии было выделено несколько типов нарушений в строении створок: смещение и утолщение осевого поля, изменения расположения рядов ареол, дефекты формы створки, нарушения формы апекса, смещение двугубого выроста и неравномерные расширения некоторых частей створки. При добавлении паклитаксела через 0.5 ч после окончания синхронизации у 27.5 % створок встречаются смещение и утолщение осевого поля. На этот же эксперимент приходится максимальное количество створок с неравномерными расширениями некоторых частей створки, с нарушениями формы створки и формы апекса, а также наибольшее количество створок со смещением двугубых выростов. Изменение регулярности (параллельности) расположения рядов ареол было наиболее выраженным у 20 % створок при воздействии паклитаксела через 1.5 ч после окончания синхронизации.

Таким образом, доля створок и характер нарушений их морфологии зависят от стадии морфогенеза, на которой паклитаксел добавляли в среду с клетками. Ингибитор, проникая в клетки диатомей и ингибируя деполимеризацию МТ, нарушает морфогенез дочерних створок.

АНАЛИЗ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ЭФФЕКТОВ МИКРОГРАВИТАЦИИ. © М. О. Хотянович, Ю. П. Стукач, Д. П. Токальчик, Ж. А. Гладкова. Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск.

Существуют противоречивые точки зрения на то, как влияет моделирование эффектов микрогравитации на межклеточные взаимодействия в нормальных и опухолевых клетках. Цель исследования — изучение особенностей межклеточных взаимодействий при моделировании эффектов микрогравитации. Исследования проводили на опухолевых (глиома С6 крысы) и неопухолевых (фибробласты человека FLv) клеточных культурах. Клетки глиомы С6 крысы и фибробластов человека FLv (концентрация $2 \cdot 10^5$ кл./мл) культивировали во флаконах объемом 25 мл в среде F10 с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки и 10^{-4} мг/мл раствора сульфата гентамицина. Для моделирования эффектов микрогравитации использовали клиноSTAT UN-KTM2 и технологию изменения положения флаконов относительно горизонтальной плоскости. Поворот флаконов на 60° осуществляли через 40—48 ч после достижения конfluence в 70 %. Через 24 ч моделирования эффектов микрогравитации наносили моноклональные антитела к интегрину β_2 , меченные флуоресцеином (R&D, США), или моноклональные антитела к кадгерину, меченные изотиоцианатом флуоресцеина (Sigma-Aldrich, США). Визуализацию и фотографирование осуществляли с помощью видеокамеры Leica DC 300F при 16-кратном увеличении флуоресцентного микроскопа MPV-2 (Leitz, Германия). Установлено, что гистохимический индекс для кадгерина в клетках глиомы С6 составил через 24 ч при расположе-

нии чашек Петри в горизонтальном положении $197.8 \pm 3.4\%$, а после поворота стекол на 60° в чашках Петри достиг $138.5 \pm 11.8\%$. Гистохимический индекс для кадгерина фибробластов человека составил через 24 ч наблюдения при расположении культуры клеток FLv в чашках Петри в горизонтальном положении $154.5 \pm 10.4\%$, а после поворота стекол на 60° в чашках Петри — $197.3 \pm 12.5\%$. Таким образом, в культуре клеток глиомы С6 при моделировании эффектов микрогравитации наблюдается ослабление экспрессии кадгерина, что совпадает с ослаблением пролиферативной активности опухолевых клеток. В культуре фибробластов FLv экспрессия молекул кадгерина увеличивается, что коррелирует с усилением кинетики пролиферативных процессов. Аналогичная направленность экспрессии молекулы адгезии выявлена в опытах с изучением распределения $\beta 2$ -интегрина. Гистохимический индекс для $\beta 2$ -интегрин клеток глиомы С6 через 24 ч наблюдения при расположении культуры в чашках Петри в горизонтальном положении составил $202.5 \pm 11.5\%$, а после поворота стекол на 60° — $122.8 \pm 10.5\%$. Гистохимический индекс для $\beta 2$ -интегрин фибробластов FLv при расположении культуры клеток в чашках Петри в горизонтальном положении составил $150.8 \pm 6.1\%$, а после поворота стекол на 60° — $214.3 \pm 3.8\%$. Таким образом, в проведенных экспериментах установлено, что при моделировании эффектов микрогравитации в опухолевых и неопухолевых клетках специфично трансформируется экспрессия молекул адгезии: в культуре фибробластов человека Flv экспрессия кадгерина и $\beta 2$ -интегрин возрастает, а в клетках глиомы С6 крыс снижается.

СИНАПТИЧЕСКАЯ ПЕРЕДАЧА ВОЗБУЖДЕНИЯ В НЕРВНО-МЫШЕЧНОМ СОЕДИНЕНИИ ПРИ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ. © В. Ф. Хузахметова^{1,2}, Н. Н. Хаертдинов,² Э. А. Бухараева,^{1,2} Г. Ф. Ситдикова.²
¹ Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, venerik87@mail.ru, и ² Казанский (Приволжский) федеральный университет.

Гипергомоцистеинемия (ГЦ) — заболевание, обусловленное повышением уровня аминокислоты гомоцистеина, вызывает ухудшение функционирования нервной системы и развитие ряда нейродегенеративных заболеваний. Даже небольшое возрастание концентрации гомоцистеина в плазме крови коррелирует с возрастными когнитивными нарушениями, наблюдается у пациентов с болезнью Паркинсона и при множественном склерозе, сопровождает развитие эпилепсии. Один из механизмов действия повышенного содержания гомоцистеина может быть связан с последствиями вызываемого им оксидативного стресса, оказывающего влияние на процессы передачи информации в синапсах как центральной, так и периферической нервной системы. Для изучения характера влияния повышенного уровня эндогенного гомоцистеина вследствие развития ГЦ была создана экспериментальная модель этого заболевания на крысах. Высокий уровень гомоцистеина в крови самок в период беременности создавался при использовании ранее описанной методики (Arutyunyan et al., 2012) путем введения в питьевой рацион крыс метионина в концентрации 1 г на 1 кг массы животного (с учетом суточного потребления воды). Развитие потомства в рамках созданной модели происходило в условиях окислительного стресса, индуцированного

повышенным уровнем гомоцистеина в плазме крови как самки, так и формирующегося плода. Наличие развившейся ГЦ контролировали по содержанию гомоцистеина в крови животных. С помощью метода экстраклеточной микроэлектродной регистрации оценивали уровень спонтанной и вызванной квантовой секреции ацетилхолина, а также степень асинхронности освобождения квантов в изолированном нервно-мышечном синапсе диафрагмальной мышцы новорожденных животных с модельной ГЦ и сравнивали эти параметры с наблюдаемыми у животных контрольной группы. У крысят 6- и 10-суточного возраста из экспериментальной и контрольной групп измеряли среднюю частоту миниатюрных токов концевой пластинки, среднее количество квантов, освобождающихся в ответ на нервный стимул, оценивали степень синхронности выделения квантов, измеряя истинные синаптические задержки одноквантовых ответов и их дисперсию. В синапсах 6- и 10-суточных крысят с ГЦ интенсивность спонтанной квантовой секреции и количество квантов, освобождаемых в ответ на нервный стимул, были значимо выше, чем у контрольных животных соответствующего возраста. При этом большее количество квантов в синапсах с ГЦ выделялось в период фазной синхронной секреции, что указывает на более высокий уровень синхронности выделения квантов в отличие от выраженного асинхронного выделения квантов, наблюдаемого у контрольных животных. Кроме того, в синапсах с ГЦ наблюдалась меньшая по сравнению с синапсами контрольной группы величина минимальной синаптической задержки одноквантовых ответов, соответствующая времени выделения наиболее быстрых и готовых к секреции квантов медиатора. Сопоставление характеристик нейросекреторного процесса в синапсах животных с моделью ГЦ и у контрольных показало, что повышение уровня эндогенного гомоцистеина при развитии ГЦ вызывает изменение процессов внутриклеточной сигнализации и приводит к «взрослению» синапсов, что проявляется в изменении параметров секреции квантов ацетилхолина, приближающихся к характерным для зрелых животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-15-00618).

ДВОЙНОЕ ВЛИЯНИЕ ИОНОВ КАДМИЯ НА КВАНТОВУЮ СЕКРЕЦИЮ АЦЕТИЛХОЛИНА В НЕРВНО-МЫШЕЧНОМ СОЕДИНЕНИИ ЛЯГУШКИ. © А. Н. Ценцевичкий,^{1,2} Э. А. Бухараева,^{1,2} Е. Е. Никольский.^{1,2}
¹ Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, atsen@list.ru, и ² Казанский (Приволжский) федеральный университет.

Ионы кадмия, как и другие двухвалентные катионы, подавляют освобождение медиатора из моторных нервных окончаний вследствие блокирования потенциал-зависимых кальциевых каналов, обеспечивающих вход ионов кальция в нервную терминаль и участвующих в запуске процесса секреции квантов ацетилхолина (Hagivara, Byerly, 1981). Вместе с тем действие ионов кадмия сопровождается образованием различных радикалов, таких как супероксид, гидроксил-радикал, а также перекись водорода (Watanabe et al., 2003). Ранее нами было показано, что в нервно-мышечном синапсе лягушки перекись водорода снижала число квантов ацетилхолина, выделяющихся в ответ на нервный стимул, а также изменяла степень

синхронности их выделения. Таким образом, изменение редокс-состояния нервной терминали существенно влияет на работу синаптического аппарата. В настоящем исследовании проверяли гипотезу о возможном оксидантном влиянии ионов кадмия на параметры секреции квантов АХ. С этой целью в условиях сниженной концентрации ионов кальция в среде осуществляли экстраклеточную регистрацию одноквантовых токов концевой пластинки (ТКП) в присутствии ионов кадмия в концентрациях 0.1, 0.5 и 1 мкМ, а также его действие при наличии в среде антиоксиданта N-ацетилцистеина. Анализировали количество квантов медиатора, освобождаемых в ответ на нервный стимул (квантовый состав), и кинетику секреции квантов, оценивая степень флуктуаций истинных синаптических задержек одноквантовых ТКП в проксимальном и дистальном отделах протяженного нервно-мышечного соединения лягушки. Хлорид кадмия дозозависимым образом снижал квантовый состав и частоту спонтанных миниатюрных токов концевой пластинки в обоих участках нервного окончания. Хлорид кадмия в концентрации 1 мкМ, как и другие специфические (ω -контотоксин GVIA, ω -агатовксин) и неспецифические (ионы магния) блокаторы потенциалзависимых кальциевых каналов, вызывал уменьшение дисперсии синаптических задержек ТКП, т. е. синхронизацию временного хода секреции медиатора. Однако в более низких концентрациях (0.1 и 0.5 мкМ) действие хлорида кадмия приводило к десинхронизации выделения квантов ацетилхолина в дистальном участке нервной терминали. Этот эффект на кинетику секреции предотвращался антиоксидантом N-ацетилцистеином, что свидетельствует о редоксзависимом влиянии ионов кадмия на временной ход секреции медиатора. Антиоксидант незначительно ослаблял подавляющее влияние ионов кадмия на величину квантового состава. Полученные данные свидетельствуют о том, что в нервно-мышечном соединении лягушки ионы кадмия обладают двойным эффектом. Блокирование потенциалзависимых кальциевых каналов приводит к снижению числа и синхронизации процесса секреции квантов ацетилхолина, выделяющихся в ответ на нервный стимул, а прооксидантное действие, напротив, проявляется в десинхронизации их освобождения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

РОЛЬ ВНЕКЛЕТОЧНОГО pH В РЕГУЛЯЦИИ КАЛЬЦИЕВОГО ВХОДА В КЛЕТКАХ JURKAT. © А. Л. Черезова,^{1,2} В. Н. Томилини,² Ю. А. Негуляев,² С. Б. Семенова.²

¹ Кафедра биофизики С.-Петербургского государственного политехнического университета (ИФНиТ), lerya_gud92@mail.ru, и ² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Известно, что кислотно-щелочной гомеостаз необходим для поддержания нормальных клеточных ответов и физиологической целостности клеток живого организма. Многие клеточные ответы, включая активность цитозольных и мембранно-связанных ферментов, активность

транспорта ионов, синтез белка и ДНК, уровень цАМФ и внутриклеточного кальция, меняются при изменении внеклеточного pH. Согласно имеющимся литературным данным, активность некоторых каналов суперсемейства TRP (transient receptor potential channel) также находится под контролем внеклеточного и (или) внутриклеточного pH. Ранее в нормальных и трансформированных лимфоцитах человека мы показали экспрессию и функциональную активность кальциевых каналов TRPV5/V6 (transient receptor potential channels subfamily V members 5 and 6). В настоящей работе исследовали влияние внеклеточного pH на активность этих каналов в клетках лимфобластной лейкемии человека линии Jurkat. С помощью метода патч-кламп, в конфигурации whole-cell были зарегистрированы входящие интегральные токи через каналы TRPV5/V6. Токи активировали в растворе с pH 7.2 при поддерживаемом потенциале на мембране -70 мВ. Затем производили смену наружного раствора на кислый раствор с pH 6.0 или щелочной с pH 8.2. Было показано, что при закислении наружного раствора величина интегральных токов существенно уменьшалась, а при защелачивании наружных растворов наблюдалось увеличение интегральных токов. Чтобы проверить влияние внеклеточного pH на уровень внутриклеточного кальция в клетках Jurkat, проводили измерения уровня внутриклеточной концентрации Ca^{2+} с использованием Ca^{2+} -чувствительного зонда Fura-2AM. Согласно полученным данным, снижение pH внешней среды приводило к снижению уровня внутриклеточного кальция, а повышение pH среды — к увеличению концентрации кальция в клетках Jurkat. Мы предполагаем, что, влияя на активность кальциевых каналов, внеклеточный pH дает возможность клеткам иммунной системы реагировать на изменения микроокружения, в том числе в местах развития различных воспалений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-04-00938) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА, ЛЕЖАЩИХ В ОСНОВЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНО-АМЕБОИДНОГО ПЕРЕХОДА ПРИ МИГРАЦИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК. © А. С. Чукина,^{1,2} Т. М. Свисткина,³ А. Ю. Александрова.¹ ¹ Российский онкологический центр им. Н. Н. Блохина, Москва, tonya_alex@yahoo.com, ² Кафедра клеточной биологии и гистологии биологического факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова и ³ Университет Пенсильвании, США.

Образование вторичных очагов опухолевого роста — метастазов — происходит за счет расселения индивидуальных клеток из первичной опухоли. В настоящее время описаны два основных способа миграции индивидуальных клеток, в основе которых лежат различные клеточные механизмы. Один, мезенхимальный, основывается на Аtp2/3-зависимой полимеризации актина, за счет которой происходит выдвигание ламеллиподии на ведущем краю клетки. Эффективность такого движения зависит от формирования контактов клетки с субстратом и значительно увеличивается при активации матриксных металлопротеаз. Другой способ миграции — амебoidalное движение, оно основано на образовании специфических протру-

зий — бляшек, представляющих собой пузыреобразное выпячивание клеточной мембраны под действием актин-миозинового сокращения. Амебоидное движение не зависит от образования адгезионных контактов с субстратом и активности матриксных металлопротеаз. Пластичность механизмов миграции клеток — это способность клеток переключиться с одного способа миграции на другой в зависимости от окружающих условий или от активности внутренних регуляторных механизмов. Мы исследовали миграционную пластичность клеток фибросаркомы человека линии HT1080 и нетрансформированных фибробластов 1036 в качестве контроля к опухолевым клеткам. Мы показали, что воздействия очень разного характера, такие как нарушение адгезивности субстрата или ингибирование комплекса Agr2/3, лимитирующие подвижность по мезенхимальному типу, могут вызывать мезенхимально-амебоидный переход (МАП) у клеток фибросаркомы, но не у нормальных фибробластов. С помощью метода платиновых реплик мы исследовали строение актинового цитоскелета на электронно-микроскопическом уровне и выявили различия между клетками, которые способны к МАП при определенных условиях, и теми, которые не показывают подобного перехода. С помощью коррелятивной видео и электронной микроскопии мы исследовали динамику изменения актинового цитоскелета в процессе амебоидного движения, выделили 4 стадии формирования бляшек и описали строение актинового цитоскелета, типичного для каждой стадии. Было проведено сравнительное исследование эффективности мезенхимального и амебоидного движений в разных условиях и доказано, что именно миграционная пластичность опухолевых клеток, т. е. их способность менять клеточные механизмы, регулирующие движение в зависимости от внешних условий, дает им серьезное преимущество при расселении по организму в процессе метастазирования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 14-04-01228а).

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СИМВАСТАТИНА НА ОРГАНИЗАЦИЮ МЕМБРАНЫ И АКТИНОВЫЙ ЦИТОСКЕЛЕТ В ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ. © В. И. Чубинский-Надеждин, Е. А. Морачевская. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, vchubinskiy@gmail.com

Фармакологические препараты группы статинов являются ингибиторами 3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзима-редуктазы — фермента, катализирующего лимитирующую стадию биосинтеза холестерина в клетках млекопитающих. Холестерин — необходимый липидный компонент клеточных мембран, который отвечает за множество физиологических функций в организме. Как известно, нарушения липидного обмена, в частности повышенный уровень циркулирующего холестерина, играют существенную роль в развитии сердечно-сосудистых патологий. Эффективность и относительная безопасность статинов сделали их наиболее широко распространенными препаратами для лечения гиперхолестеринемии и предупреждения связанных с ней осложнений. В настоящее время особый интерес привлекают плейотропные эффекты статинов, в частности их возможное применение в ка-

честве противоопухолевых и иммуномодулирующих агентов. Несмотря на большое количество публикаций медицинского профиля, адресованных эффектам статинов, механизмы их действия на клеточном и мембранном уровнях изучены явно недостаточно. В настоящей работе исследовали влияние липофильного препарата симвастатина на функциональную организацию плазматической мембраны и актиновый цитоскелет. Основными объектами служили трансформированные фибробласты 3T3B-SV40, клетки миелоидной лейкемии K562 и гепатокарциномы Нер-G2. Оценено влияние симвастатина в диапазоне концентраций от 50 нМ до 10 мкМ на жизнеспособность различных типов клеток. Показано цитотоксическое действие симвастатина на клетки лейкемии человека K562, возможно связанное с повышенной экспрессией в них гидроксиметил-глутарил-коэнзима-редуктазы. В ходе проведенного сравнительного исследования обнаружены принципиальные различия эффектов ингибитора гидроксиметил-глутарил-коэнзима-редуктазы симвастатина и акцептора стеролов метил-бета-циклодекстрина (МБЦД). При визуализации ганглиозида GM1 не выявлено нарушений целостности рафтов в мембране клеток 3T3B-SV40 после инкубации с симвастатином (до 10 мкМ). В отличие от действия акцептора стеролов МБЦД симвастатин не вызывал существенного снижения содержания холестерина в клетке. Как показано ранее, мембранные модификаторы, связывающие холестерин (МБЦД, филиппин), инициировали сборку микрофиламентов в трансформированных клетках; при этом отмечены признаки реверсии трансформированного фенотипа. После инкубации фибробластов 3T3B-SV40 с симвастатином наблюдали разборку и реорганизацию микрофиламентов, увеличение степени распластанности клеток и образование коротких актиновых пучков, вероятно в зоне инициации фокальных контактов. Можно полагать, что обнаруженные эффекты симвастатина связаны со снижением уровня изопреноидов вследствие ингибирования синтеза мевалоновой кислоты и последующего изменения статуса пренилирования малых ГТФаз семейства Rho.

ВЛИЯНИЕ ФЛАВОНОИДОВ НА УТЕЧКУ КАЛЬЦЕИНА ИЗ ЛИПОСОМ. © Е. Г. Чулков, О. С. Остроумова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ev_chulkov@mail.ru

Флавоноиды — это класс растительных полифенолов, широко представленный в высших растениях. Они имеют широкий спектр биологической активности, обусловленный их действием на мембраны. Молекулярные механизмы влияния флавоноидов на проницаемость липидных бислоевых мембран остаются недостаточно изученными. Перспективным методом исследования действия флавоноидов на мембраны является измерение утечки флуоресцентных маркеров из липосом. В работе использовали большие однослойные липосомы диаметром 100 нм из смеси диолеилфосфатидилхолина и холестерина (67 : 33 М %), приготовленные с помощью мини-экструдера в растворе 35 мМ кальцеина, 5 мМ НЕРЕС при pH 7.4. Посредством гель-эксклюзионной хроматографии на колонке с сефадексом G-75 внелипосомальный раствор заменяли свободным от кальцеина буфером (5 мМ НЕРЕС, 150 мМ NaCl, pH 7.4). Кальцеин, находящийся внутри липосом, из-за самотушения не имел зна-

чительной флуоресценции. В суспензию добавляли соответствующее количество флавоноида и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. По интенсивности флуоресценции высвобожденной из липосомы метки оценивали изменение проницаемости липидного бислоя. Дифференциальную сканирующую калориметрию выполняли на дигальмитоилфосфатидилхолиновых (ДПФХ) липосомах при помощи μ DSC7 (Setaram, Франция). Флавоноиды вводили после формирования липосом до соотношения липида к флавоноиду 9 : 1. Установлено, что флоретин и биоханин А при концентрации более 5 мкМ увеличивают утечку кальцеина из липосом. В то же время кверцетин, катехин и даидзеин подобного действия не оказывают. Выдвинуто предположение о том, что флоретин и биоханин А из-за своей относительно большей гидрофобности способны встраиваться в область на границе между гидрофильными и гидрофобными областями мембраны и увеличивать площадь, приходящуюся на липидную молекулу в бислое, т. е. снижать плотность упаковки ацильных хвостов, а следовательно, и текучесть мембраны. В то же время кверцетин, катехин и даидзеин подобного эффекта не оказывают. Данные, полученные при помощи дифференциальной сканирующей калориметрии, указывают на снижение температуры плавления ацильных цепей ДПФХ на 2 °С в присутствии флоретина и биоханина А. Катехин, даидзеин и кверцетин в тех же условиях изменяли температуру фазового перехода ДПФХ не более чем на 0.5 °С, что свидетельствует об их меньшем влиянии на подвижность углеводородных хвостов ДПФХ. Полученные данные могут быть использованы для выяснения молекулярных механизмов регуляции мембранной активности каналобразующих соединений флавоноидами.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-14-00565), НШ-1721.2014.4 и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

ДИНАМИКА ПРЕОБРАЗОВАНИЯ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА И СИСТЕМЫ МИКРОТРУБОЧЕК ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ ВЕНЫ ЧЕЛОВЕКА В ПРОЦЕССЕ ФОРМИРОВАНИЯ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ КОНТАКТОВ.
© А. С. Шахов, В. Б. Дугина, И. Б. Алиева. Научно-исследовательский институт физико-химической биологии Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, irina_alieva@belozersky.msu.ru

Эндотелий — монослой плотно прилегающих друг к другу эндотелиоцитов — выстилает внутреннюю поверхность всех сосудов организма и функционирует как селективный барьер между циркулирующей в сосудах кровью и тканевой жидкостью тех органов, в которых сосуды расположены. Эндотелиальный барьер динамичен и чувствителен к воздействию различных стимулов, при этом основная роль в осуществлении барьерной функции принадлежит эндотелиальному цитоскелету. Изменение его архитектуры при воздействиях, разрушающих целостность барьера, приводит к сжатию эндотелиоцитов, разрушению межклеточных контактов и как следствие — к повышению сосудистой проницаемости. Вещества, усиливающие эндотелиальный барьер, напротив, препятствуют описанным изменениям. В настоящей работе мы использовали монослой эндотелиоцитов вены человека

(культура клеток EA.hy926) для анализа и количественной оценки изменений цитоскелета, происходящих при формировании межклеточных контактов, от момента распластывания одиночных клеток и образования первых межклеточных контактов эндотелиоцитов с соседними клетками до формирования конфлюэнтного монослоя. В клетках эндотелия линии EA.hy926 экспрессируются две немускульные изоформы актина — β - и γ -цитоплазматические актины, которые формируют два типа структур: организованные параллельно субстрату пучки стресс-фибрилл, состоящие из β -актина, а также хорошо развитую актиновую сеть, сформированную в основном γ -актином. Количественный анализ показал, что на всех стадиях формирования монослоя эндотелиоцитов интенсивность флуоресценции β -актина была значительно выше в районе контактов клетки с соседними клетками по сравнению с областью ее свободной ламеллы. Вместе с тем γ -актиновая сеть была наиболее развитой в области ламеллы свободного края одиночных клеток. По мере формирования первых контактов эндотелиоцитов с соседними клетками интенсивность флуоресценции на свободном крае значительно падает, и в клетках, окруженных соседними, γ -актин в краевых зонах распределен более равномерно. Исследование изменений, которые претерпевает система микротрубочек, показало, что по мере формирования эндотелиального монослоя количество микротрубочек на краю клетки постепенно увеличивалось, однако количество микротрубочек в области сформированных контактов эндотелиоцитов всегда превышало их количество в свободной ламелле. Проведенный анализ вовлеченности β - и γ -изоформ актина в реорганизацию цитоскелета эндотелиоцитов показал, что обе системы немускульного актина подвержены значительным, но не однотипным изменениям. Полученные в работе данные позволяют предполагать, что обе актиновые системы, γ -актиновая сеть и β -актиновые фибриллы, специфически организованные в эндотелиоцитах, активно вовлечены в этот процесс, возможно благодаря существующей (но на настоящей момент неисследованной) механической связи с микротрубочками. Мы предполагаем, что возможные взаимодействия микротрубочек с актиновыми структурами, сформированными γ - и β -изоформами актина, могут иметь разные значения в процессе формирования монослоя эндотелиоцитов, отражая разную роль актиновых изоформ и их взаимодействия с микротрубочками в формировании и поддержании эндотелиального барьера.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 09-04-00363 и 12-04-00488).

НОВАЯ ИЗОФОРМА СУБЪЕДИНИЦЫ ФАКТОРА ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ eIF3m ЧЕЛОВЕКА УЧАСТВУЕТ В РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ, ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ И ВЕЗИКУЛЯРНОМ ТРАНСПОРТЕ. © Е. К. Шематорова, Ю. В. Долудин, Д. Г. Шпаковский, И. Ю. Словохотов, Г. В. Шпаковский. Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, gvs@ibch.ru

Ранее нами было установлено, что основными партнерами минорных изоформ hRPB11b α и hRPB11c α субъ-

единицы РНК-полимеразы II человека hRPB11 являются субъединица hRPB3, новый, ранее не описанный белок COMMD4d, а также две изоформы одной из субъединиц фактора инициации трансляции: eIF3 α (GA17) и eIF3 β , последняя из которых также обнаружена нами впервые (Биохимия. 2011, 76 (8) : 1195—1200; Цитология. 2013, 55 (3) : 172—177). Для изучения функции этого нового компонента протеома человека, кодируемого, как и eIF3 α , геном *PCID1*, мы определили уровень экспрессии специфической мРНК eIF3 β в различных органах и детально изучили интерактом белка eIF3 β в нервной (эмбриональный мозг) и иммунной (клеточная линия Jurkat) тканях человека. Анализ полученных данных показал, что белок eIF3 β участвует в регуляции по крайней мере трех важнейших клеточных процессов. Изоформа eIF3 β в отличие от eIF3 α способна проникать (активно импортироваться) в ядра клеток, где благодаря взаимодействиям с различными вариантами субъединицы РНК-полимеразы II hRPB11 и субъединицей Медиатора MED21 регулирует транскрипцию определенного набора генов, прежде всего важных для синаптогенеза и динамики цитоскелета в нейронах, при регенерации аксонов, а также в раннем гематопоэзе. Кроме того, благодаря взаимодействиям в цитоплазме клеток с α -катулином (CTNNA1), а в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) с RASIP (RAIN) eIF3 β участвует в Wnt-, ROCK/Rho- и Ras-путях внутриклеточной сигнализации. По-видимому, основной способ передачи сигнала в этих случаях заключается в том, что часть из исходно находившихся в ЭР и (или) цитоплазме молекул eIF3 β при активации одного из перечисленных путей переносится в ядро клетки. Благодаря взаимодействию с дисбиндином (DTNBP1) eIF3 β участвует в сортировке белков в аппарате Гольджи, их фиксации в эндосомах и транспорте на эндоплазматическую мембрану. Обнаруженное нами уникальное взаимодействие между eIF3 β и антивирусным белком тетерином (BST2, CD317) позволяет предположить, что eIF3 β играет важную роль в транспорте и закреплении этого белка на эндоплазматической мембране. Повышение концентрации изоформы eIF3 β в клетке должно способствовать быстрому и эффективному переносу тетерина в эндосомы и приводить к повышению антивирусной активности этого белка, что можно использовать в профилактике вирусных инфекций и в создании новых антивирусных препаратов.

СИГНАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ НА РАННЕЙ СТАДИИ ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКИ. © Б. С. Шенкман. Государственный научный центр РФ Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, bshenkman@mail.ru

При гипокинезии, иммобилизации мышц и пребывании в условиях реальной или имитируемой невесомости отмечают потерю мышечной массы (атрофия), развитие которой определяется интенсификацией протеолиза и замедлением синтеза белка, снижением жесткостных характеристик мышечной ткани (атония), изменением паттерна экспрессии изоформ ключевых сократительных и регуляторных белков (тяжелых и легких цепей миозина, тропонинов и SERCA). В основе этих феноменов лежит глубокая перестройка внутриклеточных сигнальных процессов. Так, в последние годы показано, что в первые дни

гравитационной разгрузки в мышечных волокнах постуральной камбаловидной мышцы наблюдается накопление ионов кальция (Ingalls et al., 1999, 2001; Shenkman, Nemirovskaya, 2008), которое активирует кальций-чувствительные цистеиновые протеазы, кальпаины, что приводит к интенсивному распаду цитоскелетных белков, таких как титин, небулин и десмин (Shenkman et al., 2002, 2004; Ogneva, 2010; Mirzoev et al., 2011). Не исключено, что такой деструктивный сценарий реализуется в описываемых условиях вследствие снижения концентрации оксида азота (эндогенного ингибитора кальпаинов) и снижения экспрессии белков теплового шока. В нашей лаборатории было показано, что повышение уровня оксида азота и экспрессии белков теплового шока с помощью фармакологического воздействия на фоне моделирования гравитационной разгрузки позволяет предотвратить индуцированный кальпаином распад цитоскелетных белков и повышение экспрессии E3 убиквитин лигаз (Lomonosova et al., 2011, 2012). При кратковременной моделируемой гравитационной разгрузке в экспериментах с участием человека (модель «сухой иммерсии») нами было установлено, что уже в течение 3 сут воздействия в ткани камбаловидной мышцы было достоверно снижено содержание фосфорилированной нейрональной синтазы оксида азота, что сопровождалось столь же существенным снижением уровня фосфорилирования АМФ-активируемой протеинкиназы (АМПК) (Vilchinskaya et al., 2015, в печати). Снижение содержания фосфорилированной формы АМПК было также обнаружено в аналогичных кратковременных экспериментах на животных с использованием общепринятой модели антиортостатического вывешивания. Не исключено, что снижение уровня фосфорилирования АМПК могло способствовать парадоксальному увеличению содержания фосфорилированной формы ключевой mTOR-зависимой рибосомальной киназы p70S6K в камбаловидной мышце крысы, которое было обнаружено в этих же экспериментах с разгрузкой продолжительностью 24 ч. После 3 сут воздействия и далее в течение 14 сут в наших экспериментах не было выявлено снижения уровня фосфорилирования p70S6K относительно контроля. При этом начиная с 3-х сут наблюдалось выраженное снижение интенсивности белкового синтеза. Вероятно, следует предположить, что такое снижение было результатом обнаруженного нами снижения фосфорилирования GSK3 β и повышения содержания фосфорилированной формы элонгационного фактора eEF-2 (Красный, Ломоносова и др., 2013). Таким образом, уже на ранних стадиях гравитационной разгрузки в постуральной мышце формируется специфический паттерн сигнальных реакций, приводящих к «отключению» защитных механизмов или «выпадению» боковых, но, как выясняется, лимитирующих ответвлений анаболических сигнальных путей. Эти процессы, по-видимому, и обуславливают дальнейшее лавинообразное развитие мышечной атрофии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-00888) и программы президиума РАН «Интеграция молекулярных систем для реализации физиологических функций».

GAR-ДОМЕН ФИБРИЛЛАРИНА ОТВЕЧАЕТ ЗА НАКОПЛЕНИЕ БЕЛКА В ГРАНУЛЯРНОМ КОМПОНЕНТЕ ЯДРЫШКА. © М. Ю. Шубина, Я. Р. Мусинова,

Е. В. Шеваль. Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, musinova.yana@gmail.com

Фибрилларин является одним из наиболее хорошо изученных ядрышковых белков, вовлеченных в процессы созревания пре-рРНК. Этот белок демонстрирует чрезвычайно высокую консервативность от архей до высших эукариот. Исключением является обогащенный глицинами и аргининами N-концевой домен (Glycine-Arginine-Rich, или GAR-домен), который обнаруживается только у эукариот. Роль GAR-домена в функционировании фибрилларина изучена слабо. В работе исследовали локализацию фибрилларина, GAR-домена и фибрилларина с делетированным GAR-доменом (Δ GAR). Для анализа белок и его фрагменты были слиты с EGFP. Полноразмерный фибрилларин преимущественно накапливается в плотном фибриллярном компоненте (ПФК) ядрышка, в меньшей степени в гранулярном компоненте (ГК) ядрышка и в нуклеоплазме. Δ GAR слабо накапливается в ПФК и равномерно распределен по остальной клетке (по нуклеоплазме и цитоплазме). GAR-домен локализуется в ГК ядрышка и нуклеоплазме, небольшое количество выявляется в цитоплазме. Таким образом, GAR-домен способствует накоплению фибрилларина в гранулярном компоненте ядрышка. Методом FRAP показано, что восстановление флуоресценции фибрилларина происходит в два этапа — сначала очень быстро восстанавливается флуоресценция в ГК, затем медленно восстанавливается флуоресценция в ПФК. В случае Δ GAR наблюдается только вторая компонента, т. е. медленное восстановление флуоресценции в ПФК (диффузно распределенный белок имеет крайне высокую подвижность, его динамика не могла быть зарегистрирована в выбранных условиях). И наконец, флуоресценция GAR-домена в ГК восстанавливается быстро. Таким образом, GAR-домен отвечает за высокодинамичное накопление фибрилларина в ГК ядрышка. Для выявления механизма накопления фибрилларина в ГК ядрышка за счет GAR-домена были получены мутантные формы фибрилларина, в которых разное количество аргининов было заменено на лизины либо на аланины. GAR-домен терял способность накапливаться в ядрышке, если заряженные аргинины заменяли на незаряженные аланины, но не на положительно заряженные лизины. Причем эффективность накопления в ядрышке была тем меньше, чем больше аргининов было заменено на незаряженные аминокислоты. Это позволяет предположить, что накопление в ГК ядрышка происходит за счет электростатического взаимодействия GAR-домена с ядрышковыми компонентами. Биологическая роль накопления фибрилларина в ГК пока неясна. Возможно, фибрилларин выполняет какие-то функции на поздних этапах формирования прерибосом, что требует его локализации в ГК. Однако обращает на себя внимание тот факт, что характер накопления в ГК за счет GAR-домена неспецифичен. Но даже в этом случае накопление в ГК может иметь функциональное значение, так как оно приводит к повышению концентрации белка внутри ядрышка, что может увеличивать вероятность взаимодействия с функциональными сайтами в ПФК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-01650-а).

УЧАСТИЕ АКТИНСВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА MIM В РЕГУЛЯЦИИ НАТРИЕВОГО ТРАНСПОРТА В КЛЕТКАХ СОБИРАТЕЛЬНЫХ ТРУБОЧЕК ПОЧКИ. © Л. С. Шуйский,¹ Д. В. Илатовская,² Ю. А. Негуляев,¹ А. В. Старущенко.² ¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, leonid.shuyskiy@gmail.com, и ² Медицинский колледж штата Висконсин, Милуоки, США.

Эпителиальные натриевые каналы (ENaC) относятся к семейству ионных каналов, характеризующихся специфическим блокированием диуретиком амилоридом. Экспрессия ENaC показана в различных эпителиальных тканях; в эпителии собирательных трубочек почки ENaC контролирует реабсорбцию натрия, что напрямую влияет на давление крови. Известно, что разборка F-актина приводит к увеличению вероятности открытого состояния (P_o) ENaC. Ранее нами было показано, что в клетках собирательных трубочек почки P_o ENaC уменьшается при участии актинсвязывающего белка кортактина. По всей видимости, это происходит вследствие полимеризации актиновых филаментов, которая инициируется кортактином и опосредуется комплексом Arp2/3. Недавно был обнаружен актинсвязывающий белок MIM (Missing-In-Metastasis, названный так из-за того, что его экспрессия пропадает в метастазирующих клетках), вовлеченный в регуляцию перестроек актинового цитоскелета. Было показано, что MIM колокализуется с кортактином и комплексом Arp2/3, опосредуя сборку актиновых филаментов и модулируя взаимодействие между цитоскелетом и плазматической мембраной. Целью данной работы было определить, вовлечен ли MIM в мультибелковый комплекс, отвечающий за регуляцию активности ENaC перестройками актина. На начальных этапах исследования методом Вестерн-блоттинга была показана экспрессия MIM в кортексе почки крысы. Основная работа была проведена на клетках линии СНО, трансфицированных α -, β - и γ -субъединицами ENaC мыши (mENaC), либо mENaC вместе с полноценным белком MIM (MIM WT), или различными его мутантными формами. Использование электрофизиологического метода локальной фиксации потенциала в отведении от целой клетки позволило обнаружить статистически достоверное уменьшение плотности амилорид-чувствительных токов после котрансфекции разными формами белка MIM (в пА/пФ): MIM WT — 69.6 ± 11.9 , MIM PH — 48.9 ± 7.8 , MIM Δ PRD — 178.0 ± 19.3 , MIM Δ WH2 — 146.0 ± 19.4 , MIM/IMD-L — 82.7 ± 19.8 по сравнению с контролем — 271.2 ± 18.3 . Согласно полученным данным, два домена белка MIM — PRD (связывается с кортактином) и WH2 (участвует в полимеризации актиновых филаментов) — вовлечены в регуляцию ENaC. В электрофизиологических экспериментах в отведении от участка мембраны, в клетках, котрансфицированных MIM WT, было обнаружено снижение P_o ENaC по сравнению с контролем. Полученные результаты доказывают вовлечение MIM в регуляцию ENaC актиновым цитоскелетом. Окраска родамином-фаллоидином показала изменения в структуре актинового цитоскелета: в клетках СНО трансфекция MIM WT индуцирует образование утолщенных актиновых фибрилл в подмембранной области, а также филоподий и выступов клеточной мембраны (микрошипики). MIM PH, MIM/IMD-L и MIM/IMD-S привели к схожим изменениям структуры актинового цитоскелета, тогда как MIM Δ WH2 и MIM Δ PRD не вызывали подобных изменений, что согласуется с результатами электрофизиологических экспериментов.

Полученные предварительные данные дают основания предполагать, что в собирательных трубочках почки активность ENaC регулируется перестройками актинового цитоскелета при участии сложноорганизованного мультибелкового комплекса, включающего в себя кортактин, комплекс Agr2/3 и, вероятно, МІМ. Дальнейшие исследования будут направлены на исследование механизма регуляции ENaC при участии МІМ в иммортализованной линии собирательных трубочек почки мыши с экспрессией МІМ, подавленной при помощи лентивирусной трансдукции.

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

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА ВНЕКЛЕТОЧНОГО NAD И ЕГО МЕТАБОЛИТОВ МЕТОДОМ ЯМР. © А. П. Якимов,^{1,2} В. А. Куликова,¹ К. Б. Нериновский,^{1,3} А. А. Никифоров,^{1,4} К. А. Шабалин.^{1,2} ¹ С.-Петербургский политехнический университет Петра Великого, yaleks@panobio.spbstu.ru, ² Петербургский институт ядерной физики НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, ³ С.-Петербургский государственный университет и ⁴ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Никотинамид аденин динуклеотид (NAD) является коферментом дегидрогеназ, катализирующих окислительно-восстановительные реакции центральных метаболических путей в клетках человека. Помимо этого, расщепление NAD является ключевым элементом множества сигнальных процессов. Так, динуклеотид используется для модификаций белков (деацетилирования и АДФ-рибозилирования), а также является предшественником сигнальных молекул. NAD-зависимые регуляторные процессы повсеместно присутствуют во всех организмах и не только вовлечены в адаптацию метаболизма к изменениям окружающей среды, но также участвуют в контроле фундаментальных клеточных процессов, включая старение и регуляцию клеточного цикла, экспрессию генов, репарацию ДНК, дифференцировку клеток, кальцийзависимый сигналинг, апоптоз и многие другие процессы. Успешная регуляция данных NAD-зависимых метаболических и сигнальных процессов зависит от того, насколько эффективно клетке удается поддерживать определенный уровень данного динуклеотида. Основным способом регуляции уровня NAD в клетках человека является его биосинтез из поступающих с пищей витаминов B₃: никотинамида (Nam), никотиновой кислоты (NA) и рибозидов никотинамида (NR) и никотиновой кислоты (NAR). Попав в клетку, данные метаболиты используются для синтеза моонуклеотидов NMN или NAMN. Далее NMN и NAMN аденилируются до динуклеотидов NAD и (или) NAAD соответственно. К настоящему моменту установлено, что экзогенные нуклеотиды NMN (NAMN) и NAD (NAAD) также способны эффективно поддерживать внутриклеточный пул NAD. Каким образом это происходит, на данный момент до конца не выяснено. Для изучения роли и механизмов действия экзогенных NAD и его метаболитов мы разработали метод их идентификации и количественного анализа при помощи ЯМР. Помимо этого, данный экспериментальный подход позволяет изучать механизмы транспорта предшественников NAD через

плазматическую мембрану клеток человека. Одним из основных преимуществ ЯМР-спектроскопии является то, что структурные и количественные данные могут быть получены для широкого диапазона химических веществ в одном ЯМР-эксперименте. Образцы для количественного анализа были приготовлены после осаждения белковых фракций 60%-ным ацетонитрилом с последующей лиофилизацией супернатанта. Затем образцы растворяли в натрий-фосфатном буфере (pH 7.0) на основе D₂O и измеряли спектры ЯМР с оптимально подобранными параметрами регистрации. Особенностью исследуемых метаболитов является то, что диапазон химических сдвигов пиридиновых колец находится в диапазоне 8—10 ppm, который не содержит сигналов от других веществ, имеющих в стандартной питательной среде. Разработанный нами экспериментальный подход позволяет производить количественный анализ различных биологических образцов, содержащих смесь следующих метаболитов: Nam, NR, NAR, NMN, NAMN, NAAD и NAD с концентрацией от 0.5 мкМ с погрешностью не более 10 %.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 14-04-01765а и 14-04-32117мол_а).

H₂S-ВЫЗВАННАЯ ДЕПОЛЯРИЗАЦИЯ ПОДАВЛЯЕТ СЕТЕВУЮ АКТИВНОСТЬ ГИППОКАМПА НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫСЯТ. © А. В. Яковлев, Е. В. Минькина, О. В. Яковлева, Г. Ф. Ситдикова. Кафедра физиологии человека и животных Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, alv.yakovlev@gmail.com

В 1-ю нед постнатального развития мозга в нейронах гиппокампа и мозжечка обнаруживаются высокая концентрация H₂S и высокий уровень экспрессии фермента синтеза H₂S — цистатионин-β-синтазы. Известно, что изменение концентрации тиолсодержащих соединений в организме может приводить к нарушениям во многих системах организма, в том числе сердечно-сосудистой и нервной, патологиям развития нервной системы и нейродегенеративным заболеваниям. В первые 2 нед постнатального развития в области гиппокампа наблюдается особый паттерн спонтанной сетевой активности — гигантские деполяризационные потенциалы (ГДП). ГДП являются сетевыми разрядами, напоминающими интериктальные эпилептиформные разряды, во время которых происходит активация как пирамидных, так и интернейронов гиппокампа, вследствие синергетического возбуждающего действия нейромедиаторов глутамата и ГАМК. Предполагается, что на ранних этапах онтогенеза нейрональные связи только формируются и их количество невелико, а ГДП обеспечивает синхронную активность пре- и постсинаптических клеток, НМДА-рецепторов, что способствует развитию и формированию нейронных сетей. Таким образом, целью работы было исследование эффектов и механизмов действия донора H₂S — NaHS — на популяционную активность нейронов гиппокампа у новорожденных крысят. Эксперименты проводили на горизонтальных срезах головного мозга новорожденных крысят в 1-ю нед постнатального развития (P3—P7, где P0 — день рождения). Внеклеточную регистрацию полевых потенциалов популяционной активности нейронов СА3-области гиппокампа проводили при помощи метал-

лического электрода и низкошумящего внеклеточного усилителя (DAM 80, WPI, Великобритания). Синаптические ГАМК(А)-опосредованные ответы регистрировали при помощи пэтч-кламп-регистрации в режиме «целая клетка» с фиксации мембранного потенциала на 0 мВ с использованием усилителя Axopatch 200B (Axon Instr., США). В контрольных условиях активность нейронов была сгруппирована в популяционные разряды, состоящие из группы потенциалов действия — гигантских деполяризующих потенциалов (ГДП), которые при одновременной пэтч-кламп-регистрации пирамидных клеток СА3-области сопровождалась полисинаптическими ГАМК(А)-опосредованными токами. Аппликация 100 мкМ донора H₂S вызывала значительное снижение частоты ГДП и полисинаптических ответов нейронов. Сетевая активность гиппокампа полностью восстанавливалась после отключения подачи вещества. Регистрация мембранного потенциала пирамидных клеток СА3-области в режиме «на клетке» при фиксации тока ($I = 0$) показала, что аппликация NaHS вызывала значительную деполяризацию нейронов, и это приводило к подавлению сетевой активности гиппокампа. Анализ синаптических токов, вызванных активацией глутаматных и ГАМК(А)-рецепторов, выявил, что донор H₂S оказывал необратимый ингибирующий эффект на амплитуду и время нарастания НМДА-вызванного синаптического тока нейрональной клетки у новорожденного крысенка в СА3-области гиппокампа без изменения параметров синаптических ответов, вызванных активацией АМПА- или ГАМК(А)-рецепторов. Таким образом, можно предположить, что H₂S в 1-ю нед постнатального развития гиппокампа подавляет сетевую активность, за счет деполяризации мембранного потенциала нейронов и угнетения НМДА-рецепторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-15-00618).

БЕЛОК ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА TAG7 СПОСОБЕН ВЗАИМОДЕЙСТВОВАТЬ С РЕЦЕПТОРОМ ЦИТОКИНА TNF-ALPHA И В КОМПЛЕКСЕ С БЕЛКОМ ТЕПЛОВОГО ШОКА HSP70 ВЫЗЫВАТЬ В РАКОВЫХ КЛЕТКАХ АПОПТОЗ И НЕКРОПТОЗ. © Д. В. Яшин,¹ Е. А. Романова,¹ Н. В. Гнучев,¹ Г. П. Георгиев,¹ А. Г. Габитов,^{1,2} Л. П. Сащенко.¹ ¹ Институт биологии гена РАН, yashin_co@mail.ru, и ² Институт биоорганической химии РАН, Москва.

Белок Tag7 открыт в нашем институте в 1998 г. и является одним из ключевых белков врожденного иммунитета у дрозофилы. Для Tag7 у млекопитающих также показана антимикробная активность, однако его роль у высших организмов сложнее, чем у дрозофилы. В нашей лаборатории показано, что в комплексе с белком теплового шока Hsp70 он способен вызывать лизис клеток раковых линий. Нами было показано, что комплекс Tag7—Hsp70 индуцирует в раковых клетках апоптоз и некроптоз. При этом ингибирование каспазной активности caspase 8, основной регуляторной каспазы, вовлеченной в передачу сигнала апоптоза от рецепторов смерти, не предотвращает некроптоз. Также мы показали, что комплекс двух белков Tag7—Hsp70, который индуцирует гибель опухолевых клеток, является новым лигандом для TNFR1, рецептора цитокина приобретенного иммунитета TNF-alpha. Также нами было показано, что сам белок Tag7 является новым лигандом для рецептора TNFR1, и в этом качестве ингибирует как цитотоксическую активность комплекса Tag7—Hsp70, так и цитотоксическую активность TNF-alpha.