

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ОТДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК
ОТДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ КЛЕТКИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

**РЕЦЕПТОРЫ И ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ
СИГНАЛИЗАЦИЯ**

27-30 мая 2013 г.



СБОРНИК СТАТЕЙ

Том 1

Под редакцией

В.П. Зинченко, А.В. Бережнова

Пущино
2013

УДК 576.3
ББК 28.05
Р 45

ИССЛЕДОВАНИЯ В ПРИРОДОДАЧЕ И МОДЕЛИРОВАНИИ
СИГНАЛИЗАЦИИ В НЕЙРОНАХ И МЫШЕЧНЫХ КЛЕТКАХ

Состав научного оргкомитета:
д.б.н., проф. Зинченко В.П. – председатель,
чл.корр. РАН, проф. Фесенко Е.Е.
академик РАН, академик РАМН, проф. Ткачук В.А.

Локальный оргкомитет:
Зинченко В.П., Федотова Е.И., Бережнов А.В., Долгачева Л.П.,
Кононов А.В., Толмачева А.В., Ляпина Л.Н., Иванов С.В.,
Надеев А.Д., Теплов И.Ю., Фролова М.С., Туровский Е.А., Туровская М.В.

Р 45 **Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей. Том. 1.** /
Под редакцией В.П. Зинченко, А.В. Бережнова – М.: ООО «ИД В. Ема»,
2013. – 393 с.
ISBN 978-5-91581-003-6

С 27 по 30 мая 2013 г. в г. Пущино проходила Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». В сборнике представлены 165 статей по материалам докладов участников конференции. В первый том вошли разделы:

- общие и частные вопросы сигнализации;
- рецепторы;
- кальциевая сигнализация;
- сигнализация в мышечных клетках и нейронах;
- сигнализация в синапсе;
- новые подходы и методы клеточных исследований.

Второй том содержит разделы:
– действие физиологически активных соединений. Медицинские аспекты внутриклеточной сигнализации;
– сигнализация при апоптозе и в условиях стресса. Активные формы кислорода в системе внутриклеточной сигнализации;
– сигнализация с участием митохондрий. Биоэнергетика;
– сигнализация в растительных клетках и у прокариот.

ISBN 978-5-91581-003-6

УДК 576.3
ББК 28.05

© Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки Российской академии наук, 2013

ОГЛАВЛЕНИЕ

ТОМ 1

ОБЩИЕ И ЧАСТНЫЕ ВОПРОСЫ СИГНАЛИЗАЦИИ

4

РЕЦЕПТОРЫ

108

КАЛЬЦИЕВАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ

176

СИГНАЛИЗАЦИЯ В МЫШЕЧНЫХ КЛЕТКАХ И НЕЙРОНАХ

251

СИГНАЛИЗАЦИЯ В СИНАПСЕ

318

НОВЫЕ ПОДХОДЫ И МЕТОДЫ КЛЕТОЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

373

ТОМ 2

ДЕЙСТВИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ. МЕДИЦИНСКИЕ АСПЕКТЫ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ

395

СИГНАЛИЗАЦИЯ ПРИ АПОПТОЗЕ И В УСЛОВИЯХ СТРЕССА. АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА В СИСТЕМЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ

505

СИГНАЛИЗАЦИЯ С УЧАСТИЕМ МИТОХОНДРИЙ. БИОЭНЕРГЕТИКА

636

СИГНАЛИЗАЦИЯ В РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ И У ПРОКАРИОТ

739

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

795

высокий процент CD25+ клеток коррелировал с высоким и стойким во времени уровнем фосфорилирования STAT5. В то же время в культуре покоящихся ЛПК ИЛ-2 не индуцировал поверхностную экспрессию CD25, вызывая лишь кратковременное и спадающее во времени возрастание фосфорилирования STAT5. Таким образом, в активированных митогенами ЛПК индукция поверхностной экспрессии CD25 наблюдается лишь на фоне высокого и стойкого во времени уровня активности STAT5.

Главный результат представленных исследований в том, что дляящаяся во времени, высокая активность STAT5 является необходимым условием поверхностной экспрессии CD25 и формирования полноценного рецептора ИЛ-2, в состав которого входит α -субъединица. Действительно, индуцированный взаимодействием ИЛ-2 с рецептором переход STAT5 в фосфорилированное состояние, транслокация его в ядро, индукция экспрессии гена ИЛ-2Р α и формирование полноценного, трехсубъединичного рецептора ИЛ-2 создает оптимальные условия для запуска ЛПК в клеточный цикл и последующей пролиферации.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 13-04-00234), Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», Программы Президиума РАН №7.

ЛИТЕРАТУРА

1. Crabtree G.R. // Science. 1989. V. 243. P. 355-61.
2. Berridge M.J. // Crit. Rev. Immunol. 1997. V. 17. P. 155-78.
3. Leonard W.J., Imada K., Nakajima H. et al. // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 1999. V. 64. P. 417-24.
4. Lin J.X., Leonard W.J. // Cytokine Growth Factor Rev. 1997. V. 8. № 4. P. 313-32.
5. Kim H.P., Imbert J., Leonard W.J. // Cytokine Growth Factor Rev. 2006. V. 17. P. 349-66.
6. Leonard W.J., Lin J.X. // Allergy Clin. Immunol. 2000. V. 105. P. 877-88.
7. Benczik M., Gaffen S.L. // Immunol. Invest. 2004. V. 33. № 2. P. 109-42.
8. Kim H.P., Kelly J., Leonard W.J. // Immunity. 2001. V. 15. P. 159-72.
9. Kim H.P., Leonard W.J. // EMBO J. 2002. V. 21. P. 3051-9.
10. Зенин В.В., Аксенов Н.Д., Шатрова А.Н. и др. // Цитология. 2011. Т. 53. № 8. С. 645-651.
11. Шатрова А.Н., Зенин В.В., Аксенов Н.Д. и др. // Цитология. 2011. Т. 53. № 8. С. 652-8.
12. Moriggl R., Topham D.J., Teglund S. et al. // Immunity 1999. V. 10. P. 249-59.
13. Akira S. // Oncogene. 2000. V. 19. P. 2607-11.
14. Leonard W.J. // Int. J. Hetmatol. 2001. V. 73. P. 271-7.
15. Boyum A. // J. Clin. Lab. Invest. 1968. V. 21. P. 9-29.
16. Lin J., Weiss A.J. // Cell Sci. 2001. V. 114. P. 243-4.
17. Smith-Garvin J.E., Koretzky G.A., Jordan M.S. // Annu. Rev. Immunol. 2009. V. 27. P. 591-619.

18. Kirken R.A., Rui H., Malabarba M.G. et al. // Cytokine. 1995. V. 7. P. 689-700.
19. Ghoreschi K., Laurence A., O'Shea J.J. // Immunol. Rev. 2009. V. 228. P. 273-87.
20. Nakamura Y., Russell S.M., Mess S.A. // Nature. 1994. V. 369. P. 330-3.
21. Leonard W.J., Shores E.W., Love P.E. // Immunol. Rev. 1995. V. 148. P. 97-114.
22. Marakhova I.I., Vereninov A.A., Toropova F.V. et al. // Biochim. Biophys. Acta. 1998. V. 1368. P. 61-72.
23. Kumagai N., Benedict S.N., Mills G.B., Gelfand E.W. // J. Cell. Physiol. 1988. V. 137. P. 329-36.
24. Торопова Ф.В., Виноградова Т.А., Марахова И.И. // Цитология. 2001. V. 43 № 2. P. 148-155.

ЭКСПРЕССИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПОНЕНТОВ СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В РАННЕМ РАЗВИТИИ МОРСКОГО ЕЖА *PARACENTROTUS LIVIDUS*

Никишин Д.А.^{1,2}, Милошевич И.³, Гойкович М.³, Ракич Л.⁴, Шмуклер Ю.Б.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН, Москва

²МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, РФ

³Институт биологии моря, Котор, Черногория

⁴Сербская академия наук и искусств, Белград, Сербия

Серотонин (5HT) обнаружен в яйцеклетках и ранних зародышах всех исследованных на этот предмет животных [1], причем показано, что материнский серотонин, накопленный в яйцеклетке, критически необходим для нормального морфогенеза [2]. Кроме того, имеются многочисленные экспериментальные данные, полученные физиологическими методами и демонстрирующие, что серотонин участвует в таких процессах раннего развития, как дробление [3], межblastомерные взаимодействия [4], гастроуляция [5]. Кроме того, известно, что серотонин влияет на такие функции клетки, как ресничная моторика [6] и состояние цитоскелета [7]. Классическими объектами исследования донервных функций нейротрансмиттеров являются морские ежи, для ранних эмбрионов которых показана чувствительность к нейрофармакологическим препаратам серотонинового ряда [1]. С целью охарактеризовать донервную серотонергическую систему морского ежа *P. lividus*, мы провели исследование экспрессии и функциональной активности компонентов систем синтеза, везикулярного транспорта, обратного захвата и рецепции серотонина.

Работу проводили на эмбрионах морского ежа *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) в Институте биологии моря (Котор, Черногория).

Эмбрионы получали стандартными методами [8] и инкубировали в морской воде, содержащей исследуемые вещества. На стадии плавающей бластулы эмбрионы фиксировали 4% параформальдегидом и хранили в метаноле. Иммуногистохимическое окрашивание проводили поликлональными антителами к серотонину (Chemicon) и вторичными антителами, коньюгированными с FITC (Sigma-Aldrich). Препараты просматривали на конфокальном микроскопе Olympus Fluoview FV10i (Лаборатория конфокальной микроскопии Центра коллективного пользования МГУ им. М.В.Ломоносова) при одинаковой интенсивности лазера и чувствительности детектирования. Интенсивность иммунофлуоресценции полученных изображений измеряли в программе ImageJ (NIH), статистическую обработку проводили в программе STATISTICA (StatSoft). Экспрессию генов в развитии *P. lividus* исследовали методом ОТ-ПЦР, как описано ранее [9].

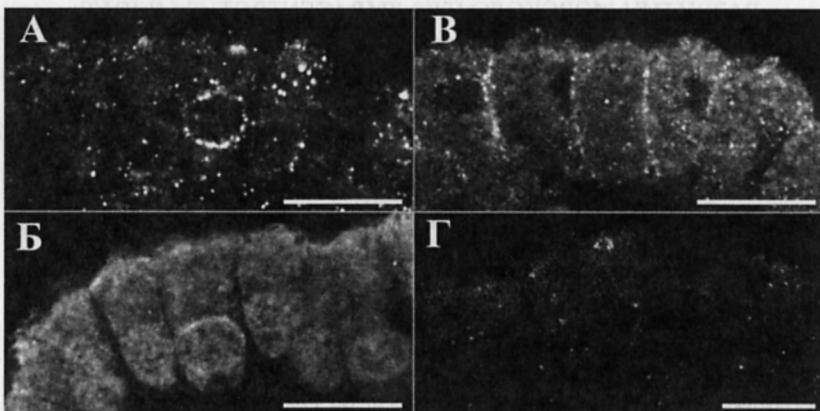


Рис.1. Иммуногистохимическое окрашивание серотонина в клетках бластул *P. lividus* в контроле (А) и после инкубации в 5HT (Б), HTP (В) и PCPA (Г). Масштабный отрезок 10 мкм.

Иммуногистохимическое окрашивание контрольных эмбрионов выявляет серотонин во всех клетках ранней бластулы. Помимо слабого окрашивания цитоплазмы, выявляется яркое точечное окрашивание, распределенное равномерно по всей клетке. По всей вероятности, таким образом, выявляется серотонин, накопленный в везикулах. В некоторых клетках заметна локализация точечного окрашивания вокруг ядра, в то же время почти во всех клетках серотонин точно выявляется внутри ядра, в свободных от хроматина участках (см. рис.1А). Также во всех клетках слабо окрашивается область размером 1-2 мкм под апикальной мембраной, в центральной ее части. Похожие структуры, окрашиваемые антителами к дофамину (так называемые дофаминовые гранулы), описаны у бластул морского ежа *Hemicentrotus pulcherrimus* [10].

82

Серотонин синтезируется из триптофана с помощью двух ферментов – триптофандроксилазы (TPH) и декарбоксилазы ароматических аминокислот (AAAD), причем TPH лимитирует синтез серотонина. Иммуногистохимическое окрашивание эмбрионов, инкубированных в ингибиторе TPH парахлорфенилаланине (PCPA, 100 мкМ), показало уменьшение числа везикул и снижение уровня цитоплазматического серотонина по отношению к контролю (см. рис.1Г и рис.2), что говорит об активности TPH на ранних стадиях развития морского ежа. При этом интенсивность окрашивания апикальных гранул не уменьшается. Для проверки активности AAAD мы инкубировали эмбрионы в предшественнике серотонина 5-гидрокситриптофане (HTP, 100 мкМ).

Иммуногистохимическое окрашивание выявило увеличение количества серотонина в клетках (см. рис.2). При этом значительно увеличивается число везикул, и часть из них локализуется вдоль латеральных поверхностей клеток (см. рис.1В). Отметим, что апикальные гранулы при инкубации в HTP не накапливают большого количества серотонина.

Для осуществления межклеточной сигнализации необходим активный транспорт серотонина в везикулы, который осуществляется везикулярным транспортером моноаминов (VMAT). Точечное

иммуноокрашивание серотонина в клетках бластулы указывает на активность везикулярного транспорта, а его локализация в межblastомерных областях инкубированных в HTP зародышей может быть связана с осуществлением им межклеточной сигнализации на ранних стадиях развития [11]. Методом ОТ-ПЦР мы проверили экспрессию гена, гомологичного VMAT, в течение эмбрионального развития *P. lividus* (см. рис.3). Однако этот ген начинает экспрессироваться на стадии гаструлы, и не экспрессируется на ранних стадиях. Возможно, везикулярный транспорт серотонина у ранних эмбрионов осуществляется с помощью другой изоформы VMAT, кодируемой другим геном, или иным способом.

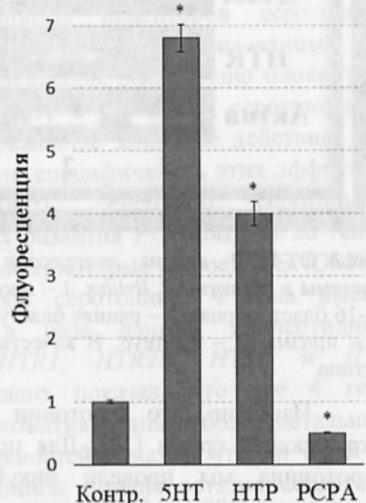


Рис.2. Средняя интенсивность иммунофлуоресценции серотонина в клетках бластул, инкубированных в соответствующих веществах. Отмечена стандартная ошибка среднего. Достоверность по У-критерию Манна–Уитни: * $p < 0,005$.

83

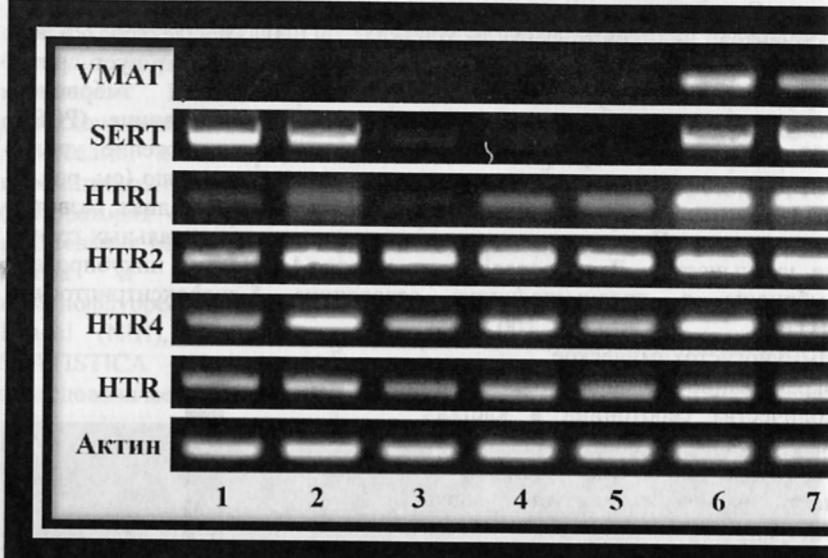


Рис.3. ОТ-ПЦР анализ экспрессии генов компонентов серотонергической системы в развитии *P. lividus*. 1 – неоплодотворенные яйцеклетки, 2 – дробление (8-16 бластомеров), 3 – ранняя бластула, 4 – мезенхимная бластула, 5 – гастроула, 6 – призма, 7 – плuteус. В качестве эндогенного контроля использовали ген актина.

Известно, что серотонин может захватываться эмбрионами из окружающей среды [12]. Для проверки активности обратного захвата серотонина мы провели инкубацию эмбрионов морского ежа в серотонине (100 мкМ). Последующее иммуноокрашивание показало, что концентрация серотонина в клетках увеличилась (см. рис.1Б и рис.2). Активный транспорт серотонина через плазматическую мембрану происходит с помощью селективного транспортера серотонина (SERT). Мы проверили экспрессию гена, гомологичного *SERT*, в развитии *P. lividus* (см. рис.3). Этот ген экспрессируется на всех стадиях развития, причем его экспрессия в течение раннего развития постепенно уменьшается, достигая минимума на стадии гастроулы, и вновь увеличивается на нейральных стадиях. Такая динамика указывает на важную роль этого гена именно на ранних стадиях развития.

При инкубации эмбрионов в экзогенном серотонине, происходит его накопление в клетках (см. рис.2), при этом серотонин выявляется равномерно по всей клетке, несколько контрастируя элементы цитоскелета (см. рис.1Б). Следует отметить, что добавление экзогенного серотонина не приводит к заметному увеличению количества везикул, в

отличие от эндогенно синтезированного серотонина. Вероятно, это связано с неактивностью системы везикулярного транспорта, в пользу чего говорит отсутствие экспрессии везикулярного транспортера моноаминов на ранних стадиях развития. В то же время, этот эффект может быть связан с регуляцией системы везикулярного транспорта, вследствие взаимодействия экзогенного серотонина с мембранными рецепторами.

В литературе описано множество эффектов, оказываемых агонистами и антагонистами серотониновых рецепторов на раннее развитие морских ежей [1]. В предварительных опытах по проверке цитостатических эффектов антагонистов серотониновых рецепторов нами было показано, что антагонисты рецепторов серотонина ((S)-WAY 100135, 5-нонилокситриптамин), характеризованные на млекопитающих как лиганды 5HT1-рецепторов, эффективно блокируют деления дробления зародышей *P. lividus*, а конъюгат серотонина с арахидоновой кислотой оказывает выраженное защитное действие, что позволяет предположить серотониновую специфичность этих эффектов. Мы предприняли попытку выявить рецепторы серотонина, экспрессирующиеся на ранних стадиях развития *P. lividus*. Из 26 генов морского ежа *Strongylocentrotus purpuratus*, которые в проекте GNOMON определены как гомологи рецепторов серотонина, 4 гена имеют гомологичные последовательности в базе данных нуклеотидных последовательностей *P. lividus* – *HTR1*, *HTR2B*, *HTR4* и *HTR* неопределенного типа. ОТ-ПЦР анализ показал, что все 4 гена экспрессируются на ранних стадиях развития. Однако более детальный анализ аминокислотных последовательностей показал, что ни один из них не содержит в 3-м трансмембранным домене остаток аспартата, консервативный среди метаботропных рецепторов серотонина [13], поэтому вопрос об экспрессии рецепторов серотонина в раннем развитии морских ежей пока остается открытым.

Таким образом, мы показали, что ранние эмбрионы морских ежей содержат серотонин, обладают активной системой его синтеза и системой обратного захвата. Эндогенно накопленный серотонин локализуется в областях межblastомерных контактов, что указывает на его возможное участие в межblastомерных взаимодействиях. В то же время при экзогенном добавлении серотонин локализуется в цитоплазме, что может быть связано с неактивностью системы везикулярного транспорта или с взаимодействием экзогенного серотонина с рецепторами.

Авторы благодарят А.Йоксимовича и Б.Лазаревича за помощь в организации работы с морскими ежами, и И.А.Косевича и Т.Д.Майорову за предоставление антител к серотонину. Работа поддержана грантом

ЛИТЕРАТУРА

1. Бузников Г.А. Нейротрансмиттеры в эмбриогенезе. 1987. М.: Наука. 282 с.
2. Cote F., Fligny C., Bayard E. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. № 1. P. 329-34.
3. Buznikov G.A., Nikitina L.A., Rakić L.M. et al. // Brain Res. Bull. 2007. V. 74. № 4. P. 221-31.
4. Shmukler Y.B., Silvestre F., Tostì E. // Zygote. 2008. V. 16. № 1. P. 79-86.
5. Мартынова Л.Е. // Онтогенез. 1981. Т. 12. № 3. С. 310-4.
6. Doran S.A., Koss R., Tran C.H. et al. // J. Exp. Biol. 2004. V. 207. № 8. P. 1415-29.
7. Бузников Г.А., Григорьев Н.Г. // Ж. эвол. биохим. физиол. 1990. Т. 26. С. 614-22.
8. Бузников Г.А., Подмарев В.И. Морские ежи *Strongylocentrotus drobachiensis*, *S. nudus*, *S. Intermedius*. // Объекты биологии развития. Москва: Наука, 1975.
9. Никишин Д.А., Семенова М.Н., Шмуклер Ю.Б. // Онтогенез. 2012. Т. 43. № 3. С. 212-6.
10. Katoh H., Suyemitsu T., Ooka I. S. et al. // J. Exp. Biol. 2010. V. 213. P. 2808-19.
11. Шмуклер Ю.Б. // Биол. Мембр. 1992. Т. 9. № 10-11. С. 1167-9.
12. Amireault P., Dubé F. // Biol. Reprod. 2005. V. 73. № 2. 358-65.
13. Shi L., Javitch J.A. // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2002. V. 42. P. 437-67.

ИЗМЕНЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК
ЛИМФОЦИТОВ У МЫШЕЙ С АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМОЙ ЭРЛИХА
В ПРОЦЕССЕ ЕЕ РОСТА

Самойлова А.А.¹, Замай Т.Н.^{1,2}

¹Сибирский федеральный университет, Красноярск

²Красноярский государственный медицинский университет
им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого, Красноярск, РФ

Межклеточная сигнализация в иммунной системе осуществляется либо путем непосредственных контактных взаимодействий клеток с антигеном или друг с другом, в которых участвуют их поверхностные молекулы, либо же с помощью цитокинов. Взаимоотношение иммунной системы и опухоли имеет сложный характер. Несомненно, что клетки иммунной системы влияют на скорость роста опухолевой массы в организме, но данные об их роли в регуляции этого процесса неоднозначны и противоречивы. Поэтому целью исследования стало изучение физико-химических характеристик лимфоцитов мышей-опухоленосителей в динамике роста асцитной карциномы Эрлиха.