

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ КЛЕТКИ
НАУЧНЫЙ СОВЕТ ПО ПРОБЛЕМАМ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ
НАУЧНЫЙ СОВЕТ ПО ФИЗИОЛОГИЧЕСКИМ НАУКАМ

МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

РЕЦЕПЦИЯ И ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ

2-4 июня 2009 г.



СБОРНИК СТАТЕЙ

Том 1

Под редакцией

В.П. Зинченко, С.С. Колесникова, А.В. Бережнова

Пушино
2009

ТОМ 1

Со 2 по 4 июня 2009 г. в Пушкино проходила Международная конференция «Рецепция и внутриклеточная сигнализация». В сборнике представлена 161 статья по материалам докладов участников конференции. В первый том вошли разделы:

- общие и частные вопросы сигнализации;
- внутриклеточная сигнализация в электровозбудимых клетках;
- внутриклеточная сигнализация в электроневозбудимых клетках;
- механизмы сигнализации в сенсорных клетках;
- кальциевая сигнализация;
- действие физиологически активных соединений. Фармакология в системе внутриклеточной сигнализации.

Второй том содержит разделы:

- 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;
- новые подходы и методы клеточных исследований.

Организаторы

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК, ОТДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИИ
ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ КЛЕТКИ
НАУЧНЫЙ СОВЕТ ПО ПРОБЛЕМАМ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ РАН
НАУЧНЫЙ СОВЕТ ПО ФИЗИОЛОГИЧЕСКИМ НАУКАМ РАН

Состав научного оргкомитета

д.б.н., проф. *Зинченко В.П.* – председатель
чл.корр., проф. *Фесенко. Е.Е.*
чл.корр., проф. *Ткачук В.А.*
д.ф.-м.н., проф. *Колесников С.С.*

Локальный оргкомитет

*Зинченко В.П., Долгачева Л.П., Бережнов А.В.,
Федотова Е.И., Кононов А.В., Туровский Е.А.,
Ляпина Л.Н., Агафонова Т.А.*

ОБЩИЕ И ЧАСТНЫЕ ВОПРОСЫ СИГНАЛИЗАЦИИ	5
--------------------------------------	---

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ
В ЭЛЕКТРОВОЗБУДИМЫХ КЛЕТКАХ

Сигнализация в мышечных клетках и нейронах	120
--	-----

Сигнализация в синапсе	163
------------------------	-----

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ В ЭЛЕКТРОНЕВОЗБУДИМЫХ КЛЕТКАХ	217
---	-----

МЕХАНИЗМЫ СИГНАЛИЗАЦИИ В СЕНСОРНЫХ КЛЕТКАХ	238
--	-----

КАЛЬЦИЕВАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ	269
-------------------------	-----

ДЕЙСТВИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ. ФАРМАКОЛОГИЯ В СИСТЕМЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ	317
--	-----

ТОМ 2

СИГНАЛИЗАЦИЯ ПРИ АПОПТОЗЕ И В УСЛОВИЯХ СТРЕССА	411
--	-----

АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА В СИСТЕМЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ	512
--	-----

СИГНАЛИЗАЦИЯ С УЧАСТИЕМ МИТОХОНДРИЙ. БИОЭНЕРГЕТИКА	565
---	-----

СИГНАЛИЗАЦИЯ В РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ И У ПРОКАРИОТ	644
--	-----

НОВЫЕ ПОДХОДЫ И МЕТОДЫ КЛЕТОЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	709
--	-----

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ	758
---------------------	-----

рецепторы, методом RT-PCR выявил во вкусовой ткани транскрипты M_1 и M_3 -рецепторов. В ряде экспериментов вкусовые клетки идентифицировались электрофизиологически [2,3] и их ответы на карбахол регистрировались методом patch clamp. При одновременной регистрации внутриклеточного Ca^{2+} и ионных токов было показано, что карбахол мобилизует Ca^{2+} в клетках типа I и стимулирует входящий ток. В клетках других типов ответы на карбахол не детектировались. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что вкусовые клетки типа I экспрессируют мускариновые рецепторы, которые сопряжены с фосфоинозитидным каскадом.

Работа выполнена при поддержке грантов Президента РФ (МК-783.2007, МК-1332.2008.4), РФФИ (№08-04-00033-а) и Фонда содействия отечественной науке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ogura T. //J. Neurophysiol. (2002) 87: 2643-9;
2. Romanov R.A., Kolesnikov S.S. //Neurosci. Lett. (2006) 395: 249-54;
3. Romanov R.A. et al. //EMBO J. (2007) 26: 657-67.

МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СИГНАЛИЗАЦИИ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ СЕТЧАТКИ

Рогачевский В.¹, Shirao T.², Hartmann E.³, Duden R.³, Majoul I.³

¹Институт биофизики клетки РАН, Пущино

²Высшая школа медицины, Университет Ганма, Маибаши, Япония

³Центр структурной и клеточной биологии в медицине, Институт биологии, Университет Любека, Германия

Не смотря на то, что в эмбриональном периоде новообразованная сетчатка представлена группой неспециализированных клеток (рис.1а), вскоре после рождения сетчатка быстро развивается в высшей степени организованную структуру нервной системы, состоящую из нескольких основных слоев (рис.1б). При этом распределенные по слоям клетки остаются специфично связанными межклеточными щелевыми контактами, которые различаются по проницаемости к ионам, включая Ca^{2+} , к цАМФ, IP3 и другим вторичным посредникам. Функциональная значимость такой организации в том, что она обеспечивает проведение мощного потока зрительной информации в мозг. Сигналы от фоторецепторных клеток (ФК), расположенных во внешнем слое сетчатки, через биполярные клетки (БК) среднего слоя сетчатки проходят

напрямую к ганглионарным клеткам (ГК), расположенных во внутреннем слое сетчатки. Количественное соотношение этих типов клеток ФК:БК:ГК в сетчатке взрослых животных соотносится почти как 10:5:1, что в геометрическом смысле представляет строгую пирамидную иерархию с вершиной на ганглионарных клетках.

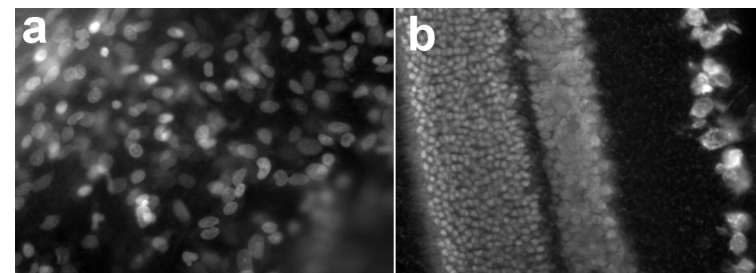


Рис.1. а) недифференцированная сетчатка эмбриона крысы (E19); б) постнатальная дифференцировка клеток сетчатки крысы (P30). Три слоя клеток: ФК, БК и ГК, слева направо.

Интересно, что перед тем как вся эта пирамидная структура вступит в действие, появляются два других типа клеток, которые разделяют пул митотических и постмитотических клеток (рис.1а). Эти слои сетчатки содержат также горизонтальные клетки, которые практически четко разделяют всю массу нейронов на две части, отделяя, таким образом, фоторецепторные клетки от клеток биполярных. Почти в это же время амакринные клетки (АК) начинают контролировать область, в которой БК клетки образуют основные входы на клетках ганглионарных.

Эти два внутренних слоя менее исследованы и, возможно, являются наиболее интересными для изучения сигнализации и контроля проведения потока информации. Ключевым аспектом и наиболее интригующей особенностью в регуляции сигнализации между этими клетками и в регуляции пространственной организации их контактов является способность этих контактов к тонкой подстройке, во-первых, в период развития, и, во-вторых, при светоадаптации.

Недавно мы показали, что в новообразованных слоях горизонтальных и амакринных клеток наблюдается высокий уровень экспрессии дребрин – белка, экспрессия которого изменяется в онтогенезе [1]. Мы также показали, что коннексин Сх43 непосредственно связывается с дребрином; детально это проанализировано в наших предыдущих работах [2,3]. Здесь мы представляем результаты *in vivo* и *in vitro* исследований роли дребрин, который экспрессируется в двух сплайс-вариантах: дребрин Е (embryonic) – в эмбриональном периоде, и

дребрин А (adult) – у взрослых. Наша идея заключается в том, что дребрин может быть необходим в межклеточной сигнализации посредством коннексинов в ходе быстрой реструктуризации межклеточных контактов и при установлении спецификации слоев сетчатки. Также известно, что как горизонтальные клетки, так и АК экспрессируют целый спектр нейрональных коннексинов: Cx36, Cx45, Cx57 [4]. Функциональная роль взаимодействия дребрина и коннексинов остается неясной. Щелевые контакты, по-видимому, участвуют в регуляции диффузионного сопряжения в новообразующемся слое сетчатки, между близлежащими горизонтальными клетками и между АК, но не между ГК. Несмотря на то, что на наиболее ранних стадиях диффузионное сопряжение в слое горизонтальных и в слое амакриновых клеток не показано, это может быть связано реструктуризацией контактов между клетками в ходе их миграции при созревании сетчатки. В этот эмбриональный период (E15-20), различные комбинации антагонистов глутамата, или ГАМК_A-рецепторов не влияют на межклеточное сопряжение. Конкретную роль коннексинов в слоях горизонтальных и амакриновых клеток более детально пока лишь предстоит исследовать. Одна из идей состоит в том, что сопряжение между горизонтальными и между амакриновыми клетками (возможно холинэргическими АК) посредством щелевых контактов является переходной – ранней фазой нейротрансмиссии, которая предшествует формированию химических синапсов.

Интересно то, что полностью сформированная нейротрансмиссия и генерация электрических волн возбуждения в сетчатке у млекопитающих могут происходить посредством щелевых контактов, до того как сформирована химическая нейротрансмиссия. Известно, что коннексины проницаемы для цАМФ [5,6]. Этот вторичный посредник может модулировать цитоплазматические волны цАМФ в кластерах смежных клеток и существенно влиять на распространение волн ионов Ca²⁺. Таким образом, щелевые контакты играют очень важную роль в распределении слоев, до того как вступит в действие химическая нейротрансмиссия.

Для того чтобы лучше понять роль ранней экспрессии дребрина мы совместили внутриутробную электропорацию иРНК дребрина в мозг эмбрионов с клеточными *in vitro* методами и экспрессировали дребрин с нейрональными коннексинами в нейронах и других клетках (рис.2). Наши *in vitro* эксперименты по реконструкции проявили удивительную роль дребрина в стабилизации нейрональных коннексинов в областях контактов между клетками (рис.2b). Для проверки полученных данных мы также использовали иРНК дребрина и показали, что в отсутствие дребрина нейрональные коннексины не транспортируются к плазматической мембране (рис.2a) и клетки не образуют контактов друг с другом.

Наблюдение за одиночными фибробластами, несущими иРНК дребрина, с использованием высокоразрешающей прижизненной микроскопии проявляет то, каким образом в отсутствие дребрина нарушаются как доставка Cx36 к плазматической мембране, так и образование межклеточных контактов. Согласно данным иммунофлуоресцентного анализа, наблюдается колокализация Cx36 с лизосомными маркерами, а на вестерн-блоттах проявляются дополнительные полосы деградации коннексина. Таким образом, вместо того чтобы двигаться к плазматической мембране несвязанный с субмембранными скаффолд-белками Cx36 подвергается деградации.

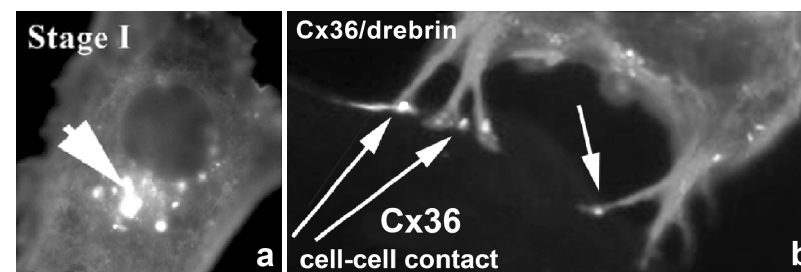


Рис.2. а) деградация коннексина Cx36 в лизосомах клеток трансфицированных иРНК дребрина; б) экспрессия дребрина значительно увеличивает количество Cx36 в области контактов между клетками, и предотвращает его деградацию.

Полученные результаты подтверждают способность высоко морфогенетически активного белка дребрина стабилизировать и пространственно регулировать перестройку межклеточных контактов обеспечивая, таким образом, быструю настройку межклеточной сигнализации. Эти неожиданные результаты не просто углубляют понимание сложности регуляции процессов протекающих в ходе развития, но показывают (рис.3) как двустороннее взаимодействие между цитоскелетом и межклеточными контактами может влиять на комплексные процессы сигнализации и передачи зрительной информации, как в сетчатке, так и в мозге в целом. Известно, что среди других коннексинов Cx36 наиболее проницаем для цАМФ, при этом он экспрессируется в самых различных тормозных ГАМК-эргических интернейронах. Таким образом, индуцируемая дребрином реструктуризация межклеточных контактов может регулировать не только возбуждающие связи идущие от ГК, но также обеспечивать комплексную тормозную регуляцию ганглионарных клеток. Остается открытым вопрос о том, как регулируется экспрессия самого дребрина в ходе развития и при каких локальных условиях.

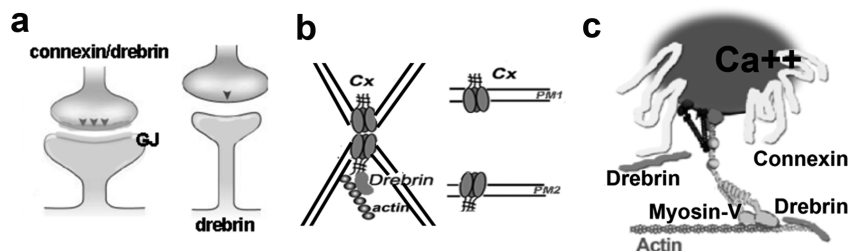


Рис.3. а) дребрин – высоко морфогенетически активный белок способен изменять форму дендритных шипиков; б) опосредованная коннексинами стабилизация синапса придает ему большую пластичность, и в критических случаях (напр. болезнь Альцгеймера, синдром Дауна и т.д.) не позволяет терять раз образованного контакта между пре- и постсинапсом; без дребрина в ходе миграции или при других пластических процессах клетки не могут поддерживать установленного взаимодействия; в) возможные молекулярные механизмы лежащие в основе формирования межклеточных контактов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Majoul I. et al. //Limiting transport steps and novel interactions of Connexin-43 along the secretory pathway (submitted) (2009);*
2. *Butkevich E. et al. //Curr. Biol. (2004) 14: 650-8;*
3. *Majoul I. et al. //Histochem. Cell Biol. (2007) 127: 355-61;*
4. *Söhl G., Maxeiner S., Willecke K. //Nat. Rev. Neurosci. (2005) 6(3): 191-200;*
5. *Hampson E.C., Vaney D.I., Weiler R. //J. Neurosci. (1992) 12(12): 4911-22;*
6. *Mills S.L., Massey S.C. //Nature (1995) 377(6551): 676-7.*

КАЛЬЦИЕВАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ

ВЛИЯНИЕ ТЕСТОСТЕРОНА НА ФЛУКТУАЦИЮ КАЛЬЦИЯ В КЛЕТКАХ ГРАНУЛЕЗЫ СВИНЕЙ

Денисенко В.Ю., Кузьмина Т.И.

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных, СПб

Механизм негеномного действия андрогенов зависит от типа клеток. В murine Т-клетках рецепторы к андрогенам опосредуют вход Ca^{2+} через потенциалнезависимые, блокируемые Ni^{2+} кальциевые каналы [1]. В остеобластах крысы тестостерон индуцирует вход внеклеточного Ca^{2+} через потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы, а также освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо путем активации фосфолипазы С [2]. На ооцитах свиней было показано, что тестостерон при определенных условиях ингибирует их спонтанное созревание [3]. Так, при добавлении одного тестостерона отмечен эффект ингибирования созревания ооцитов, при совместном же действии тестостерона и дбцАМФ эффект ингибирования усиливался. Целью настоящего исследования явилось изучение влияния тестостерона на флуктуацию цитоплазматического кальция в соматических клетках антральных овариальных фолликулов (клетках гранулезы) свиньи.

Материал и методика. В экспериментах использовали яйцники свиньи на стадии фолликулярного роста, без признаков видимой патологии. Клетки гранулезы аспирировали из антральных фолликулов диаметром 3-6мм. Ресуспендирование гранулезы осуществляли в модифицированной среде Дюльбеко, содержащей 36мг/л пирувата Na и 1г/л глюкозы, в присутствии 1% бычьего сывороточного альбумина. Осаждение клеток после 30мин инкубации проводили центрифугированием при 250g в течение 10мин и затем ресуспендировали в инкубационной среде с бычьим сывороточным альбумином в концентрации, уменьшенной до 0.1%.

Цитозольный кальций в клетках гранулезы измеряли с помощью зонда Fura-2AM. Клетки гранулезы инкубировали в течение 30мин в инкубационной среде, содержащей 5мкМ Fura-2AM при температуре 37°C. Окрашенные клетки отмывали в инкубационной среде и затем центрифугировали при 250g в течение 10мин. Процедуру отмывания повторяли трижды. Концентрация клеток в пробе составляла – 5×10^5 кл/мл. Измерение цитозольного кальция в клетках гранулезы проводили на спектрофлуориметре Hitachi. Длины волн возбуждения для

Научное издание

**Международная конференция
РЕЦЕПЦИЯ И ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ**

(2–4 июня 2009 г.)

Сборник статей

Под редакцией В.П. Зинченко, С.С. Колесникова, А.В. Бережнова

Том 1

Материалы изданы в авторской редакции с пленок, предоставленных ИБК РАН

Лицензия ЛР №040829 от 11 июля 1997 г.

Налоговая льгота – общероссийский классификатор продукции
ОК–005–93, том 2; 953000 – книги и брошюры.

Подписано в печать 05.05.2009 г. Формат 60×90/16. Печать офсетная.
Бумага офсетная. Усл.печ.л. 25,5. Тираж 160 экз. Заказ 10720.

Отпечатано с оригинала-макета в Объединенном научно-техническом издательстве
Пушкинского научного центра РАН.
142290, г.Пушино Московской обл., проспект Науки, 3. ОНТИ.