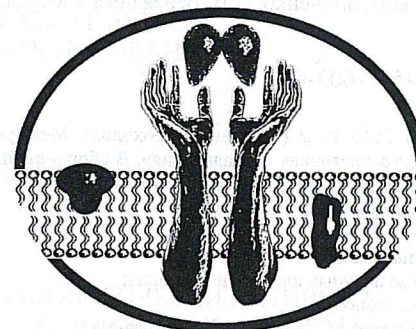


РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ОТДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК
ОТДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ КЛЕТКИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

РЕЦЕПТОРЫ И ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ

27-30 мая 2013 г.



СБОРНИК СТАТЕЙ

Том 1

Под редакцией

В.П. Зинченко, А.В. Бережнова

Пушино
2013

УДК 576.3

ББК 28.05

Р 45

Состав научного оргкомитета:

д.б.н., проф. *Зинченко В.П.* – председатель,

чл.корр. РАН, проф. *Фесенко Е.Е.*

академик РАН, академик РАН, 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.

УДК 576.3

ББК 28.05

ISBN 978-5-91581-003-6

© 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

кальция, при коэкспрессии CaSR/eGFP и CaSR/DsRed наблюдалось FRET-взаимодействие рис.3.

В следующем эксперименте проверялась возможность образования гетеродимерного рецептора из химерных белков CaSR/DsRed и GPRC6A/eGFP. Функциональность конструкции GPRC6A/eGFP предварительно проверялась с помощью конфокальной микроскопии, и было показано, что данная химерная конструкция локализуется в мембране рис.4. При коэкспрессии конструкций GPRC6A/eGFP и CaSR/DsRed оказалось, что отношение сигналов эмиссии при возбуждении на 480 нм и 535 нм достоверно не отличается, что свидетельствует против гетеродимеризации этих двух рецепторов.

Работа поддержана грантом РФФИ 12-04-31507.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chang W. et al. // Cell Calcium. 2004. V. 35. P. 183-96.
2. Brown E.M. et al. // Nature. 1993. V. 366. P. 575-80.
3. Chattopadhyay N., Brown E.M. // Cell. Signal. 2000. V. 12. P. 361-6.
4. Bystrova M.F. et al. // J. Cell. Sci. 2010. V. 123. P. 972-82.
5. Quinn S.J. et al. // Kluwer Academic Publishers. 2003. P. 203-26;
6. Zhao G. et al. // Cell. 2003. V. 115. P. 255-66.

ЗАВИСИМОСТЬ КИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ЭФРИНОВОГО РЕЦЕПТОРА EPH2 ОТ УРОВНЯ ЕГО ЭКСПРЕССИИ И ИНТЕРНАЛИЗАЦИИ

Шаронов Г.В.^{1,2}, Балацкая М.Н.², Астапова М.В.¹,
Колосов П.М.³, Феофанов А.В.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. акад. М.М.Шемякина и

Ю.А.Овчинникова РАН, Москва

²Факультет фундаментальной медицины
МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва

³Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, РФ

Введение. Эфринные рецепторы (Eph) принадлежит к классу рецепторных тирозинкиназ и выполняют функцию межклеточного узнавания. Сигнальная система эфрины/Eph участвует в процессах формирования границ тканей, навигации сосудов и нервов, взаимодействии различных типов клеток в стенках сосудов и нервных

волокон, адгезии и инвазии лейкоцитов в тканях. В ходе эмбрионального развития EphA2 появляется одним из первых среди рецепторов EphA (8-10 день у мышей) и является характерным маркером вентральной и дорзальной мезодермы, плакоидной чешуи (границы эктодермы и мезодермы) и, вместе с EphA4 и EphA5, вентральной эктодермы [1]. У мышей нокаутных по EphA2 наблюдается меньшее число перicyтов, и, как следствие, более разветвленные и менее стабильные сосуды, а также сопутствующая гиперчувствительность к респираторным патогенам [2].

В связи с ключевой ролью Eph в морфогенезе ткани нарушение их нормального функционирования часто наблюдается в раковых опухолях [3]. Так, методом количественной масс-спектрометрии EphA2 был идентифицирован как белок, обладающий повышенным уровнем экспрессии и активации в опухоли предстательной железы, груди и различных линиях раковых клеток, а также как маркер негативного прогноза развития опухоли [4-6]. При этом в работе Зелински с коллегами была отмечена неспособность EphA2 к активации эфрином в трансформированных клетках [5]. В тоже время гиперэкспрессия EphA2 в нормальных клетках вызывала злокачественную трансформацию, а его стимуляция эфрином снимала проонкогенный эффект гиперэкспрессии EphA2. Впоследствии было показано, что наличие лиганда совместно с функционально-активным EphA2 существенно подавляет вероятность возникновения и развитие опухоли [7,8]. За счет чего проявляются проонкогенные свойства EphA2 в отсутствие эфрина, остается неясным.

В данной работе мы впервые показали, что активность и способность к активации EphA2 существенно зависят от уровня его экспрессии в клетке. При этом дезактивация рецептора происходит за счет его интернализации вследствие связывания с эфрином.

Результаты и обсуждение. Для определения уровня экспрессии и локализации EphA2 мы создали химеру EphA2 с циановым флуоресцентным белком (EphA2-CFP). Для измерения киназной активности EphA2 мы использовали специфические антитела против фосфорилированных тирозинов примембранного домена (ТПМД, Tyr588, Tyr594) EphA2, фосфорилирование которых необходимо и достаточно для активации киназного домена [9]. Активация эфрином-A3 (10 мкг/мл) созданного химерного рецептора в клетках HEK293 со стабильной экспрессией EphA2-CFP вызывала трехкратное увеличение фосфорилирования ТПМД, что доказывает его функциональную активность (рис.1). Отметим, что активация EphA2-CFP носит импульсный характер, достигает максимального значения через 2-5 мин и спадает до начального уровня через 10-20 мин после стимуляции. Для определения связи между уровнем экспрессии, и активностью EphA2 в отсутствие стимуляции и после стимуляции

эфрином мы применяли количественный метод анализа индивидуальных клеток – проточную цитометрию. Для обеспечения наиболее широкого диапазона уровней экспрессии EphA2-CFP мы использовали транзientную трансфекцию в клетках HEK293. Анализ методом проточной цитометрии показал, что даже в отсутствии стимуляции эфрином, в клетках с высоким уровнем экспрессии (CFP++) фосфорилирован по ТПМД, т.е. активирован (рис.2). Стимуляция 10 мкг/мл эфрина-A3 приводила к возрастанию фосфорилирования ТПМД в клетках с умеренной экспрессией EphA2-CFP (CFP+) более чем в 4 раза, в то время как в CFP++ клетках – менее чем в 2. Таким образом, гиперэкспрессия EphA2 приводит к его спонтанной активации и невосприимчивости к лиганду, т.е. к нарушению функционирования сигнальной системы эфрин/EphA.

Мы предположили, что регуляция активности и чувствительности EphA2 может осуществляться за счет изменения его локализации в клетке. Мы обнаружили, что EphA2-CFP обладает двумя характерными типами распределения в клетке: на плазматической мембране (ПМ) и в везикулярных компартментах в цитоплазме. Из клонов клеток HEK293 со стабильной EphA2-CFP мы отобрали для дальнейших

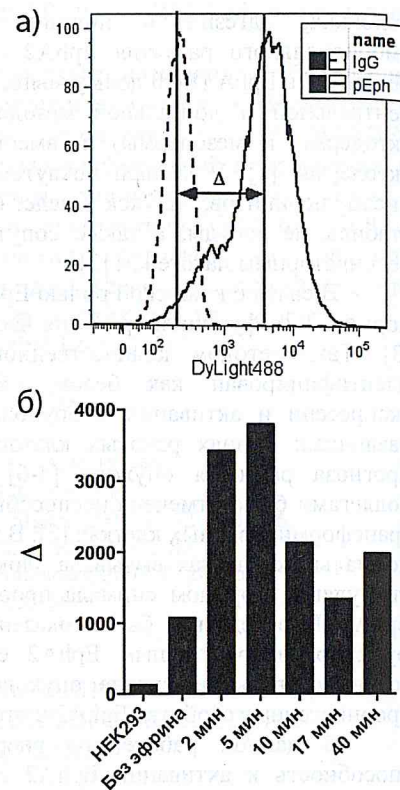


Рис.1. Анализ активности EphA2-CFP методом проточной цитометрии. а) Гистограммы распределения клеток, окрашенных антителами на фосфорилированные ТПМД (pEph, сплошная кривая) и изотипическим иммуноглобулином (IgG, пунктирная кривая). Разницу между медианами этих двух распределений использовали как меру активации EphA2 (Δ). б) Активация EphA2-CFP для клеток HEK293 дикого типа и со стабильной экспрессией EphA2-CFP без добавления эфрина и через указанные промежутки времени после стимуляции 10 мкг/мл эфрина-A3.

исследований те, в которых присутствует преимущественно первый тип распределения (НЕК-ПМ), второй (НЕК-Ц) и соизмеримое их соотношение (НЕК-ПМ/Ц). Ранее нами было показано, что стимуляция эфрином НЕК-ПМ/Ц приводит к кластеризации и интернализации EphA2-CFP [10]. Для выяснения того, в какой момент и где происходит активация EphA2, т.е. проявляется его киназная активность, мы сравнили локализацию EphA2-CFP и его фосфорилированной по ТПМД формы (pEphA2). При этом мы использовали эфрин в комплексе с флуоресцентно-мечеными антителами, что позволило нам идентифицировать рецептор, интернализированный в комплексе с эфрином. Анализ полученных данных показал, что как до, так и как на всем протяжении эксперимента после (40 мин), pEphA2 локализован на ПМ, либо в непосредственной близости (<2 мкм) от неё (рис.3а, наконечники стрелок). Уже через 10 мин после добавления эфрина можно отчетливо наблюдать везикулы с интернализированным EphA2, но при этом во всех таких везикулах полностью отсутствует киназная активность EphA2 (рис.3а, стрелки). Эти данные указывают на то, что интернализация достаточно быстро приводит к дезактивации рецептора. При этом не исключает возможности того, что основная киназная активность EphA2 проявляется на начальных этапах интернализации.

При стимуляции клона НЕК-ПМ 10 мкг/мл эфрина-A3 мы наблюдали интенсивное связывание эфрина, однако кластеризация и интернализация эфрина и EphA2-CFP практически отсутствовали (рис.3б). Известно, что стимуляция EphA2 лигандом приводит к его интернализации и последующей деградации в лизосомах, причем фосфатаза SHIP2 служит ингибитором эндоцитоза [11,12]. Мы предположили, что отсутствие эфрин-стимулированной интернализации в клоне НЕК-ПМ может быть вызвано повышенной активностью цитоплазматических(ой) фосфатаз(ы). Инкубация клеток с ингибитором фосфатаз Na_3VO_4 (1 мМ×3 ч) вызвала существенное перераспределение EphA2-CFP с ПМ в цитоплазматические везикулы (рис.3в), что указывает на его спонтанную активацию и интернализацию. Сниженная активность/экспрессия фосфатаз(ы), вероятно, также является причиной внутриклеточной локализации EphA2-CFP в клоне НЕК-Ц. Большая часть EphA2-CFP-содержащих везикул оказалось лизосомами [10], что свидетельствует о том, что такая локализация является следствием спонтанной активации.

Заключение. В данной работе мы впервые показали, что высокий уровень экспрессии вызывает активацию EphA2 даже в отсутствии лиганда. Интернализация служит механизмом быстрой дезактивации рецептора. Полученные данные также свидетельствуют о том, что

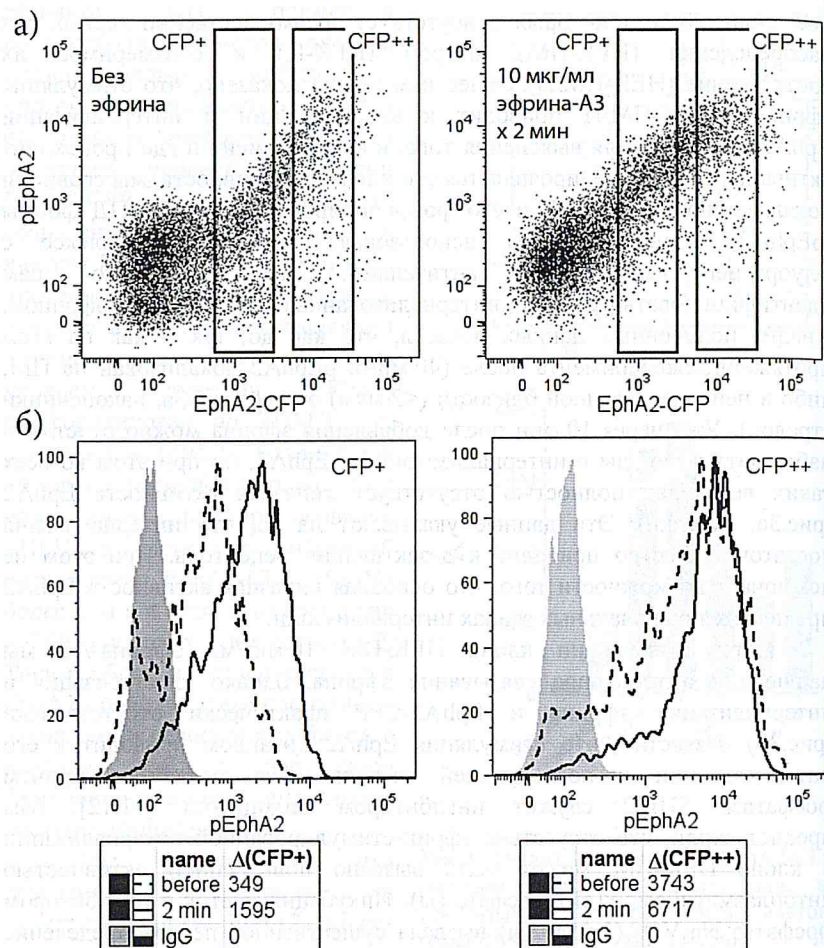


Рис. 2. Распределение клеток HEK293 с транзиторной экспрессией EphA2 в соответствии с уровнем экспрессии EphA2-CFP и уровнем его фосфорилирования (pEph) до и 2 мин после стимуляции 10 мкг/мл эфрина-А3. **а)** Точечные гистограммы, описывающие зависимость фосфорилирования от уровня экспрессии до и после стимуляции. На гистограммах отмечены области с умеренным (CFP+) и высоким (CFP++) уровнем экспрессии EphA2-CFP. **б)** Одномерные гистограммы распределения популяций CFP+ и CFP++ в соответствии с уровнем фосфорилирования до (пунктирная кривая) и 2 мин после (сплошная кривая) стимуляции, а также распределение клеток, окрашенных изотипическими контрольными иммуноглобулинами (серая заполненная кривая). Снизу приведены значения медиан распределения (Δ , см. рис. 1а).

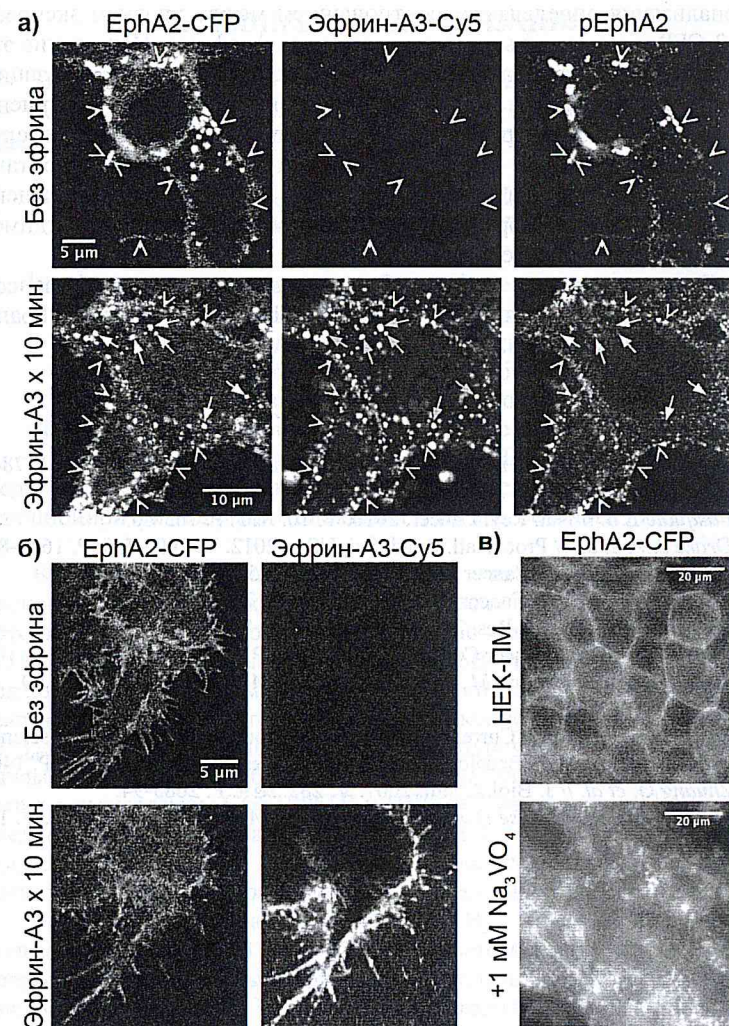


Рис. 3. Локализации EphA2-CFP и его активной формы (pEphA2). **а)** Локализация EphA2-CFP, эфрина и pEphA2 до и 10 мин после добавления 10 мкг/мл эфрина-А3 в комплексе с Cy5-меченным вторичными антителами (эфрин-А3-Cy5). Клетки фиксированы и окрашены pEphA2-специфическими антителами. Наконечниками стрелок отмечена ПМ перпендикулярно её поверхности. Стрелки указывают на некоторые везикулы, с интренилизированным эфрином. **б)** Распределение EphA2-CFP и эфрина до и 10 мин после стимуляции эфрином-А3-Cy5 клон клеток HEK с наиболее выраженной локализацией EphA2-CFP на ПМ (HEK-ПМ). **в)** Распределение EphA2-CFP в клоне HEK-ПМ до и 3 ч после ингибирования клеточных фосфатаз 1 мМ Na_3VO_4 .

интернализация определяется соотношением между уровнем экспрессии EphA2-CFR и активностью внутриклеточных фосфатаз. Нарушение этого баланса в пользу фосфатаз приводит к отсутствию интернализации и постоянной активации рецептора либо в результате повышенной экспрессии, либо в результате стимуляции лигандом. В случае преобладания EphA2 над фосфатазами происходит спонтанная интернализация и деградации в лизосомах. В обоих случаях рецептор теряет возможность нормально функционировать, что, по-видимому, обуславливает его онкогенные свойства.

Благодарности. Работа была выполнена при финансовой поддержки РФФИ (грант № 12-04-32266). ШГВ был поддержан грантом Президента РФ МК-5003.2013.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Saeger B.M., Suhm M., Neubüser A.* // Dev. Dyn. 2011. V. 240. № 6. P. 1578-85.
2. *Okazaki T. et al.* // Am. J. Pathol. 2009. V. 174. № 6. P. 2388-99.
3. *Pasquale E.B.* // Nat. Rev. Cancer. 2010. V. 10. № 3. P. 165-80.
4. *Drake J.M. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. № 5. P. 1643-8.
5. *Zelinski D.P. et al.* // Cancer Res. 2001. V. 61. № 5. P. 2301-6.
6. *Hochgräfe F. et al.* // Cancer Res. 2010. V. 70. № 22. P. 9391-401.
7. *Guo H. et al.* // Cancer Res. 2006. V. 66. № 14. P. 7050-8.
8. *Macrae M. et al.* // Cancer Cell. 2005. V. 8. № 2. P. 111-8.
9. *Nievergall E., Lackmann M., Janes P.W.* // Cell. Mol. Life Sci. 2012. V. 69. № 11. P. 1813-42.
10. *Sharonov G.V. et al.* // Current microscopy contributions to advances in science and technology. V. 1. Badajoz Spain: Formatex Research Center. 2012. P. 140-7.
11. *Zhuang G. et al.* // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. № 4. P. 2683-94.
12. *Walker-Daniels J., Riese D.J. 2nd, Kinch M.S.* // Mol. Cancer Res. 2002. V. 1. № 1. P. 79-87.

КАЛЬЦИЕВАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ

ВЛИЯНИЕ АГОНИСТОВ 5HT1B- И 5HT2B-РЕЦЕПТОРОВ CGS12066B И BW723C НА ОБМЕН ИОНОВ КАЛЬЦИЯ В ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ И СОСУДИСТУЮ СОКРАТИМОСТЬ

Авдонин П.В.^{1,2}, Надеев А.Д.³, Жарких И.Л.², Фёдорова Е.С.¹,
Суханова И.Ф.¹, Кожеевникова Л.М.², Гончаров Н.В.⁴

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

²Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научно-исследовательский институт общей патологии и
патофизиологии» РАМН, Москва

³Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биофизики клетки РАН, Пущино

⁴Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова РАН, СПб, РФ

Введение. В эндотелиальных и гладкомышечных клетках кровеносных сосудов экспрессируется несколько типов рецепторов серотонина (5HT-рецепторов). Ранее было показано, что агонисты 5HT1B- и 5HT2B-рецепторов CGS12066B и BW723C вызывают расслабление аорты и брыжеечной артерии крысы [1]. Оба эти вещества вызывают увеличение цитоплазматической концентрации ионов кальция ($[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$) в эндотелиальных клетках (ЭК) пупочной вены человека [2]. Задачами исследования были оценка роли вне- и внутриклеточного кальция в вызываемом CGS12066B и BW723C увеличении $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ в ЭК, исследование характера взаимодействия 5HT1B- и 5HT2B-рецепторов между собой и с другими видами рецепторов, исследование механизмов, лежащих в основе сосудорасслабляющего действия этих рецепторов.

Методы. Для активации 5HT1B- и 5HT2B-рецепторов использовали CGS12066B и BW723C, соответственно. Силу сокращения изолированных кольцевых фрагментов аорты крысы измеряли в изометрическом режиме. Изменения цитоплазматической концентрации ионов кальция ($[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$) в культивируемых эндотелиальных клетках (ЭК) пупочной вены человека регистрировали с помощью флуоресцентного зонда CalciumGreen. Для регистрации образующейся внутри ЭК перекиси водорода использовали флуоресцентный зонд 2,7-дихлорофлуоресцеин диацетат (H2DCF-DA). Флуоресценцию измеряли с помощью планшетного спектрофлуориметра Synergy 4 (BioTec, США). ЭК выращивали в 96-луночном планшете.

Результаты. Для оценки роли вне- и внутриклеточного кальция в кальциевых сигналах проводили определение реакции ЭК на добавление CGS12066B и BW723C в бескальциевой среде в присутствии 100 мкМ