

## АНАЛИЗ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ЦИТОСКЕЛЕТНЫЕ БЕЛКИ, ЛИЧИНОК *Drosophila melanogaster* В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ ЭФФЕКТОВ МИКРО- И ГИПЕРГРАВИТАЦИИ РАЗЛИЧНОЙ ДЛИТЕЛЬНОСТИ

© 2017 г. М.С. Куприянова\* \*\*, И.В. Огнева\* \*\*

\*ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, 123007, Москва, Хорошевское шоссе, 76а;

\*\*Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ, 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8/2

E-mail: [iogneva@yandex.ru](mailto:iogneva@yandex.ru)

Поступила в редакцию 13.09.16 г.

После доработки 07.10.16 г.

Проведен поиск генов, кодирующих цитоскелетные белки у плодовой мушки, которые потенциально могут быть кандидатами на роль триггеров в механочувствительности клеток. Использовали центрифугирование для моделирования эффектов гипергравитации (группа 2g) и постоянное изменение ориентации личинок в поле силы тяжести для моделирования эффектов микрогравитации (группа 0g) в течение 1,5, 6, 12 и 24 ч. Оценивали содержание мРНК различных генов, кодирующих как компоненты тубулинового, так и актинового цитоскелета, методом qRT-PCR. В группе 0g содержание мРНК бета-тубулина и *Msp*s было снижено уже через 1,5 ч воздействия и оставалось таковым вплоть до 12 ч, а через 24 ч превышало уровень контроля. При этом содержание мРНК субъединиц шаперонинсодержащего Т-комплекса полипептидов 1 восстанавливалось раньше – через 6 и 12 ч пребывания в условиях микрогравитации. В то же время воздействие гипергравитации приводило к более существенным изменениям содержания мРНК компонентов комплекса TSP1, нежели тубулина и *Msp*s. Содержание мРНК изоформ бета-актина в условиях микро- и гипергравитации снижалось вплоть до 12 ч воздействия, однако далее в микрогравитационных условиях оно так и оставалось сниженным, а в гипергравитационных – восстанавливалось (*Act87E*) и даже превышало (*Act57B*) контрольный уровень. Содержание мРНК супервиллина практически не менялось. В микрогравитационных условиях содержание мРНК фимбрина падало (к 24 ч восстанавливалось), а альфа-актинина – существенно росло к 12 ч воздействия, а через 24 ч уменьшалось до контрольного уровня. В гипергравитационных условиях, наоборот, содержание мРНК фимбрина сначала росло, а через 24 ч падало ниже контроля, а альфа-актинина – было существенно снижено, а через 24 ч – превышало контрольный уровень. Аналогичные результаты были получены ранее в экспериментах на грызунах, однако подобную динамику отмечали для изоформ альфа-актинина-1 и 4, в то время как для фимбрина изменений не было. Поскольку у *Drosophila melanogaster* нет изоформы альфа-актинина-4, выдвинута гипотеза, что его роль в клетке играет фимбрин.

*Ключевые слова:* механочувствительность клеток, микрогравитация, цитоскелет, актинсвязывающие белки, тубулинсвязывающие белки, *Drosophila melanogaster*.

С момента возникновения жизни на Земле все живые организмы развивались под влиянием силы тяжести. Эволюционно сформировался ряд разнообразных решений проблемы удержания собственного веса организмом в гравитационном поле Земли [1–3]. В целом механические напряжения, возникающие под действием силы тяжести на организм, возрастают с увеличением массы, тем не менее, даже одиночные клетки восприимчивы к изменению силы тяжести.

Для экспонирования клеток в условиях измененной силы тяжести путем постоянного из-

менения ориентации клеток в поле используют либо 2D-модель (горизонтальный клиностат), либо 3D-устройство (RPM – random position machine) [4–9].

Для различных типов клеток, которые культивировали на клиностате или с использованием random position machine, отмечали изменения клеточного профиля, дезорганизацию как актинового, так и тубулинового цитоскелета, увеличение числа апоптотических клеток в культуре [10–15]. Кроме того, имели место изменение локализации митохондрий и их кластеризация [16].

Дезорганизация актинового цитоскелета приводит к накоплению G-актина, что в свою очередь активирует Rho-зависимые сигнальные пути [17–19] и может регулировать MAP-киназный каскад в результате уменьшения уровня фосфорилирования ERK1/2<sup>МАРК</sup> [17,20,21]. Более того, уже через сутки культивирования в условиях измененной ориентации в поле силы тяжести в клетках отмечалось транзитное изменение уровня экспрессии генов, кодирующих белки актинового цитоскелета и ассоциированных с ним элементов [9].

Тем не менее первичные этапы реакции клеток на изменение внешних механических условий пока изучены мало, и поиски механосенсора далеки от своего окончания. Мы предполагаем, что любое изменение внешних условий для клетки находит свое отражение в деформациях ее кортикального цитоскелета, которые различны при увеличении и уменьшении нагрузки, что приводит к диссоциации от кортикального цитоскелета различных актинсвязывающих белков и, как следствие, к запуску разных сигнальных путей [22]. Для различных клеток грызунов (клеток скелетных мышц и кардиомиоцитов) при уменьшении нагрузки мигрирует в цитоплазму (и далее имеет возможность транслоцироваться в ядро) альфа-актинин-4, затем снижается уровень экспрессии гена альфа-актинина-4; при увеличении нагрузки не меняется содержание и экспрессия гена альфа-актинина-4, а подобные изменения происходят с альфа-актинином-1 [23–26]. Следует отметить, что, проведя анализ экспрессии целого ряда генов, кодирующих цитоскелетные белки в мышечных клетках крысы в условиях моделирования эффектов микрогравитации, мы не обнаружили других кандидатов на роль такой пары, которую представляют собой альфа-актинины 1 и 4.

Однако учитывая, что подобный механизм может быть универсальным для любого типа клеток и связан не только с изоформами альфа-актинина, но и с другими организующими цитоскелет белками, интерес представляет скрининговый анализ, в том числе анализ содержания мРНК цитоскелетных генов, который возможен, например, на плодовых мушках *Drosophila melanogaster*, имеющих в принципе только одну изоформу альфа-актинина, с целью поиска других кандидатов на роль механосенсоров, что и явилось целью данной работы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования служили личинки третьей стадии развития плодовой мушки *Drosophila melanogaster* линии Canton S, которых

размещали в пробирках типа Eppendorf, закрывая воздухопроницаемой пробкой. В пробирках находилась твердая стандартная (для разведения дрожифилы) питательная среда следующего состава: вода – 1000 мл, агар-агар – 7 г, сахарный песок – 40 г, манная крупа – 40 г, пекарские дрожжи – 25 г, пропионовая кислота – 10 мл.

Моделирование эффектов гравитационной разгрузки (группа 0g) проводили с использованием 3D разнонаправленного относительно вектора силы тяжести вращения, осуществляемого с использованием random position machine в течение 1,5, 6, 12 и 24 ч. Увеличение внешнего механического воздействия до 2g (группа 2g) осуществляли с использованием центрифуги короткого радиуса (0,1 м) и углом ротора 45° также в течение 1,5, 6, 12 и 24 ч. Группа контроля находилась в стандартных условиях (группа 1g). Личинок всех групп исследования (0g, 1g, 2g) содержали при температуре +23°C и по окончании воздействия немедленно замораживали.

**Определение содержания мРНК методом количественной ПЦР.** Для определения содержания мРНК генов, кодирующих ряд цитоскелетных и метаболических белков, выделяли тотальную РНК из замороженных личинок, используя RNeasy Micro Kit (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя. Обратную транскрипцию осуществляли, используя в качестве затравки d(T)<sub>15</sub> и 500 нг РНК. Для оценки содержания мРНК исследуемых генов проводили ПЦР в реальном времени с использованием праймеров, подобранных с помощью программы Primer3Plus (таблица). Для оценки уровня различий использовали метод  $2(-\Delta\Delta C(T))$  [27].

**Статистическая обработка.** Полученные в ходе экспериментов результаты статистически обрабатывали с помощью метода ANOVA, используя для оценки достоверности отличий между группами постхоковский *t*-тест с уровнем значимости  $p < 0,05$ . Данные представляли в виде  $M \pm SE$ , где  $M$  – среднее арифметическое,  $SE$  – ошибка среднего значения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

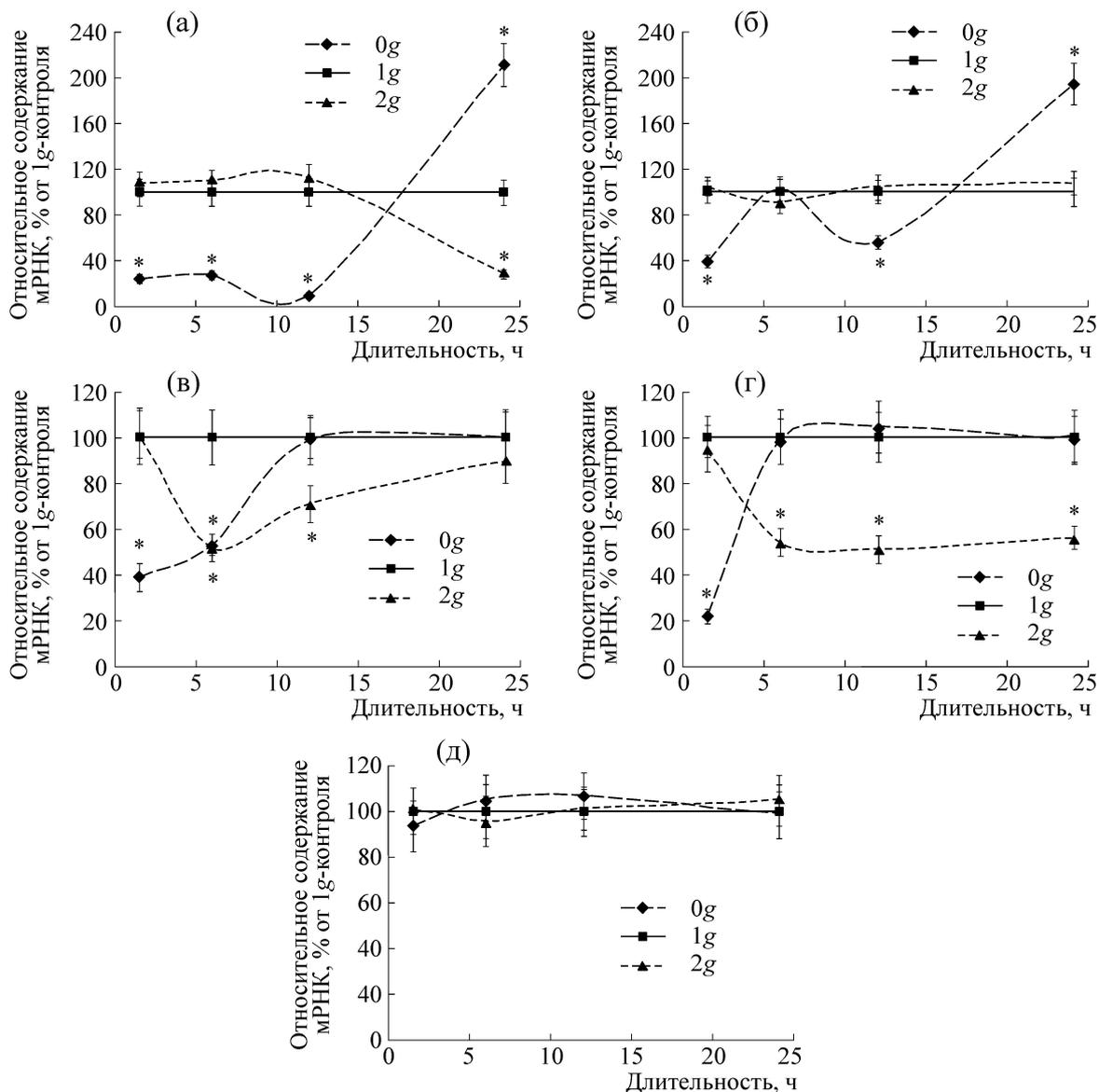
Содержание мРНК всех исследованных генов в контрольной группе 1g в течение всего периода исследования (24 ч) практически не отличалось между 1,5, 6, 12 и 24 ч, а колебания значений оставались в пределах статистической ошибки. Тем не менее нормировку полученных значений в экспериментальных группах проводили на значение в соответствующей контрольной группе.

Последовательность праймеров и размер продуктов

Ген	Направление	Последовательность праймера (5'...3')	Размер продукта, п.о.
<i>Act57B</i> (актин 57В, бета-актин)	Прямой	<i>ccccatccacttgtaatcg</i>	115
	Обратный	<i>tcggggaagttgttaggttc</i>	
<i>Act87E</i> (актин 87Е, бета-актин)	Прямой	<i>aggaaccgcgattgtaacag</i>	96
	Обратный	<i>tcttgtgtctcctcaactcctc</i>	
<i>Act5C</i> (актин 5С, гамма-актин)	Прямой	<i>gatcgggatggtcttgattc</i>	149
	Обратный	<i>gtgggtccgctcttttcac</i>	
<i>Arpc3</i> (Arp2/3 комплекс, субъед. 3)	Прямой	<i>cccaataaatggtggacctg</i>	119
	Обратный	<i>accctcgtagaagcaaaaac</i>	
<i>Tmod</i> (тропомодулин)	Прямой	<i>gacaaccaatccaaccaacc</i>	70
	Обратный	<i>ctgacgtccaattcatgtcg</i>	
<i>Svil</i> (супервиллин)	Прямой	<i>atgagggtggatcagctttg</i>	120
	Обратный	<i>ttgaagcactggagttgcac</i>	
<i>Fim</i> (фимбрин)	Прямой	<i>agacctaccgcaattggatg</i>	126
	Обратный	<i>agttgacaataccggcttg</i>	
<i>Actn</i> (альфа-актинин)	Прямой	<i>acaagccgaacattgaggag</i>	96
	Обратный	<i>gcgtttccatcgtgtagttg</i>	
<i>Betatub85D</i> (бета-тубулин 2В)	Прямой	<i>gtggcggcgtgaataatag</i>	119
	Обратный	<i>atgctaaggcccaaatgacc</i>	
<i>Msp5</i> (гомолог СКАР5)	Прямой	<i>aaataacccccgaggaattg</i>	127
	Обратный	<i>cttatttcgccagaagctg</i>	
<i>Tcp1</i> (Т-комплекс 1)	Прямой	<i>caagatcattggtgctgacg</i>	83
	Обратный	<i>cacgggatctgtgatttc</i>	
<i>Cct5</i> (Т-комплекс, шаперонин 5)	Прямой	<i>ggagtcaaaaaactccaagg</i>	143
	Обратный	<i>caccaccgtaaacaatacgc</i>	
<i>T-cpleta</i> (субъединица 7 Tcp1)	Прямой	<i>atcgtgctcctcaagaagg</i>	71
	Обратный	<i>caggcattgatgttgacac</i>	
<i>Cyt-c</i> (цитохром с)	Прямой	<i>tgctggatggtgagaagg</i>	99
	Обратный	<i>agattgggtccaacctgtg</i>	
<i>Gapdh</i> (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа)	Прямой	<i>aaagcggcagtcgtaatagc</i>	80
	Обратный	<i>tcttcgacatggctgagttc</i>	

**Содержание мРНК генов, кодирующих компоненты тубулинового цитоскелета** (рис. 1). В группе 0g содержание мРНК всех исследованных генов, кодирующих компоненты тубулинового цитоскелета, за исключением *T-cpleta*, менялось аналогичным образом: через 1,5 ч было снижено, а далее начинало расти до уровня контроля или превышая его. В группе 2g изменения были отмечены для содержания мРНК гена, кодирующего бета-субъединицу тубулина (через 24 ч мРНК *Betatub85D* было снижено на 72% ( $p < 0,05$ ) относительно 1g), *Tcp1* и *Cct5*. При этом содержание мРНК *T-cpleta* не менялось ни в группе 0g, ни в группе 2g.

**Содержание мРНК генов, кодирующих изоформы актина.** Динамика изменения относительного содержания мРНК генов, кодирующих изоформы бета-актина *Act57B* (рис. 2а) и *Act87E* (рис. 2б) была схожей при увеличении и уменьшении внешнего механического поля в течение 1,5, 6 и 12 ч: оно существенно снижалось относительно уровня 1g. Так, через 12 ч в группе 0g содержание *Act57B* и *Act87E* было ниже на 49% ( $p < 0,05$ ), относительно группы 1g; в группе 2g их содержание было снижено на 89% ( $p < 0,05$ ) и на 90% ( $p < 0,05$ ) относительно контроля. Однако через 24 ч в группе 0g *Act57B* и *Act87E* оставались ниже уровня контроля на 44% ( $p < 0,05$ ) и 62% ( $p < 0,05$ ) соответственно,



**Рис. 1.** Относительное содержание мРНК генов, кодирующих компоненты тубулинового цитоскелета: (а) – бета-тубулин 2В (*Betatub85D*), (б) – *Msp5* (гомолог СКАР5), (в) – Т-комплекс 1 (*Tcpl*), (г) – шаперонин 5 Т-комплекса (*Cct5*), (д) – субъединица 7 Тср1 (*T-cpl1*); \* –  $p < 0,05$  по сравнению с группой 1g.

в то время как в группе 2g содержание *Act87E* восстанавливалось до уровня контроля, а *Act57B* – превышало его на 94% ( $p < 0,05$ ).

Другой была динамика изменения содержания мРНК гена, кодирующего гомолог гамма-актина *Act5C* (рис. 2в). Через 1,5 ч в группах 0g и 2g его содержание было ниже, чем в группе 1g на 82% ( $p < 0,05$ ) и 44% ( $p < 0,05$ ) соответственно. Однако далее в группе 0g содержание *Act5C* начинало увеличиваться и восстанавливалось до контрольного уровня через 24 ч. В группе 2g через 6 и 12 ч содержание было таким, как в группе 1g, а далее снова

снижалось на 49% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем.

**Содержание мРНК генов, кодирующих актинсвязывающие белки.** Динамика изменения содержания мРНК генов, кодирующих белки, связывающиеся с мономерами актина *Arpc3A* (рис. 3а) и *Tmod* (рис. 3б), была сходной в группе 0g и в группе 2g. Так, в группе 0g содержание мРНК *Arpc3A* и *Tmod* через 1,5 ч было ниже, чем в контроле на 62% ( $p < 0,05$ ) и 84% ( $p < 0,05$ ) соответственно; затем начинало восстанавливаться и через 24 ч уже превышало уровень группы 1g на 83% ( $p < 0,05$ ) и 284% ( $p < 0,05$ ) соответственно. При этом в группе

2g содержание *Arpc3A* и *Tmod* уже через 6 ч существенно превышало контрольный уровень (на 96% ( $p < 0,05$ ) и 270% ( $p < 0,05$ ) соответственно), достигая максимума через 12 ч, а через 24 ч снижалось до контроля (*Tmod*) или на 43% ( $p < 0,05$ ) ниже (*Arpc3A*).

Содержание мРНК супервиллина *Svil* (рис. 3в) в группе 0g от контроля не отличалось ни в одной точке измерения, а в группе 2g – только через 24 ч превышало уровень 1g на 95% ( $p < 0,05$ ).

В группе 0g содержание мРНК *Fim* (рис. 3г) через 1,5, 6 и 12 ч было ниже контроля (на 63% ( $p < 0,05$ ), 59% ( $p < 0,05$ ) и 32% ( $p < 0,05$ ) соответственно), а через 24 ч – не отличалось от него; в то же время содержание мРНК *Actn* (рис. 3д) через 1,5 и 6 ч не отличалось от контроля, через 12 ч – было выше на 44% ( $p < 0,05$ ), а через 24 ч – возвращалось к контрольным значениям.

Напротив, в группе 2g содержание мРНК *Fim* (рис. 3г) через 1,5 и 6 ч не отличалось от контроля, через 12 ч – было выше на 71% ( $p < 0,05$ ), а через 24 ч – ниже контроля на 64% ( $p < 0,05$ ); содержание мРНК *Actn* (рис. 3д) через 1,5, 6 и 12 ч было ниже контроля (на 29% ( $p < 0,05$ ), 46% ( $p < 0,05$ ) и 52% ( $p < 0,05$ ) соответственно), а через 24 ч – превышало контрольный уровень на 52% ( $p < 0,05$ ).

Содержание мРНК генов, кодирующих глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу и цитохром *c* (рис. 4). Относительное содержание мРНК генов *Gapdh* и *Cyt-c* в группе 0g не отличалось от контрольного уровня на протяжении всего периода воздействия, за исключением того, что через 1,5 ч содержание мРНК *Cyt-c* было ниже, чем в группе 1g на 44% ( $p < 0,05$ ). При этом в группе 2g через 1,5 ч оно было ниже на 39% ( $p < 0,05$ ), через 6 ч – на 72% ( $p < 0,05$ ), через 12 ч – на 44% ( $p < 0,05$ ), через 24 ч – восстанавливалось до контрольного уровня. Содержание мРНК *Gapdh* в этой группе от уровня контроля отличалось только через 12 ч – было ниже на 62% ( $p < 0,05$ ).

ОБСУЖДЕНИЕ

Изменение содержания мРНК генов, кодирующих компоненты тубулинового цитоскелета, при моделировании эффектов микрогравитации было существенно более выраженным, нежели в условиях моделирования гипергравитации. Так, в группе 0g содержание мРНК тубулина было снижено уже через 1,5 ч воздействия и оставалось таковым вплоть до 12 ч, а через 24 ч превышало уровень контроля. Аналогичная динамика была отмечена и для

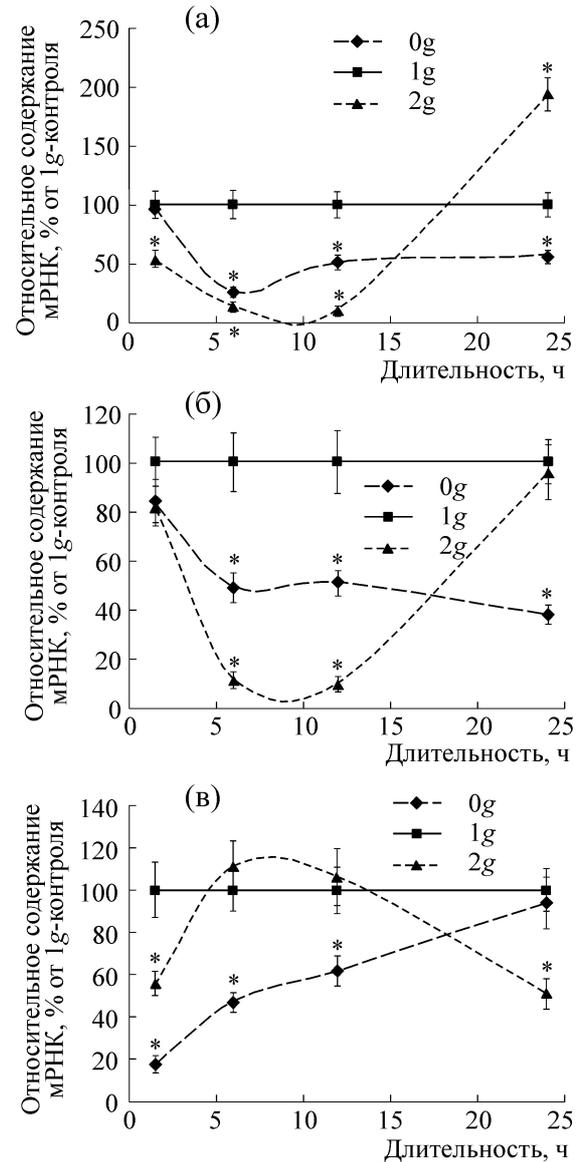
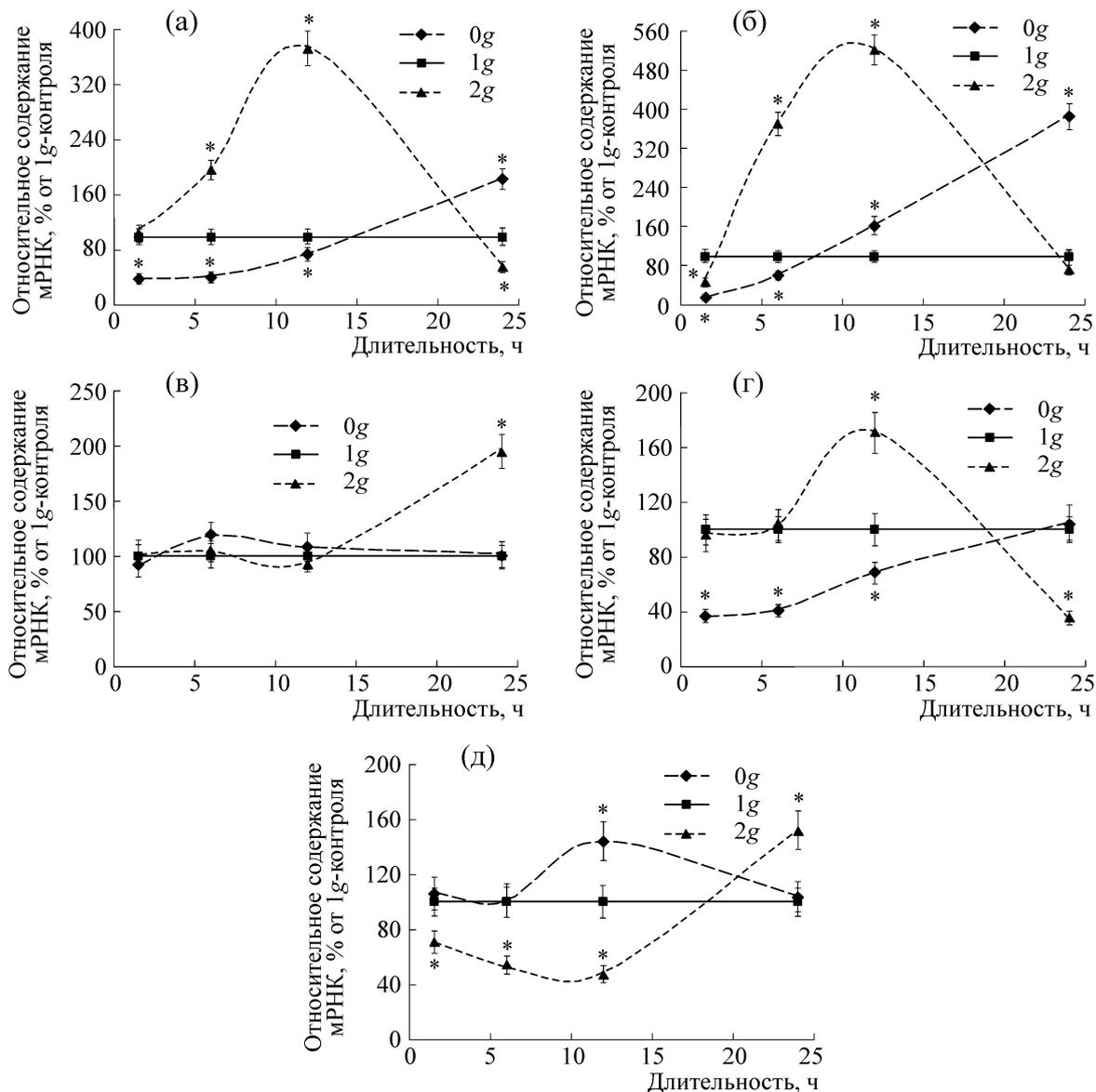


Рис. 2. Относительное содержание мРНК генов, кодирующих изоформы актина: (а) – бета-актин *Act57B*, (б) – бета-актин *Act87E*, (в) – гамма-актин *Act5C*; \* –  $p < 0,05$  по сравнению с группой 1g.

содержания мРНК гена *Msp*s. MSPS (гомолог СКАР5, ХМАР215) – это цитоскелетный белок семейства ХМАР215/Dis1-белков, который связывает микротрубочки между собой и с мембраной, организуя тубулиновый цитоскелет. Кроме того, ХМАР215 связывается с плюс-концом микротрубочек, препятствуя их разрушению [28], и участвует в формировании веретена деления в соматических клетках [29]. При этом содержание мРНК субъединиц шаперонинсодержащего Т-комплекса полипептидов 1 – других тубулинсвязывающих белков – восстанавливалось раньше – через 6 и 12 ч пребывания



**Рис. 3.** Относительное содержание мРНК генов, кодирующих актинсвязывающие белки: (а) – субъединица 3 комплекса Arp2/3 (*Arpc3A*), (б) – тропомодулин (*Tmod*), (в) – супервиллин (*Svitl*), (г) – фимбрин (*Fim*), (д) – альфа-актинин (*Act*); \* –  $p < 0,05$  по сравнению с группой 1g.

в условиях микрогравитации. Данный комплекс участвует в фолдинге цитоплазматических белков, в частности актина и тубулина [30]. Вновь синтезированные альфа- и бета-субъединицы тубулина собираются в гетеродимеры с помощью комплекса TSP1 [31]. Содержание субъединиц ССТ снижается со снижением активности шаперонов в зависимости от стадии клеточного цикла, в частности в М-фазе, восстанавливаясь в S-фазе [32]. Более того, комплекс TSP1 участвует в биогенезе циклина Е, способствующего движению клетки по клеточному циклу из фазы G1 в фазу S [33]. В то же время воздействие гипергравитации приводило к более существен-

ным изменениям содержания мРНК компонентов именно комплекса TSP1, нежели тубулина и Msps, что может быть связано с их преимущественной ролью в фолдинге белков, нежели в связи цитоскелета с мембраной (в отличие от MSPS).

Содержание мРНК изоформ бета-актина в условиях микро- и гипергравитации снижалось вплоть до 12 ч воздействия, однако далее в микрогравитационных условиях оно так и оставалось сниженным, а в гипергравитационных – восстанавливалось (*Act87E*) и даже превышало (*Act57B*) контрольный уровень. Подобную динамику на столь ранних сроках воздей-

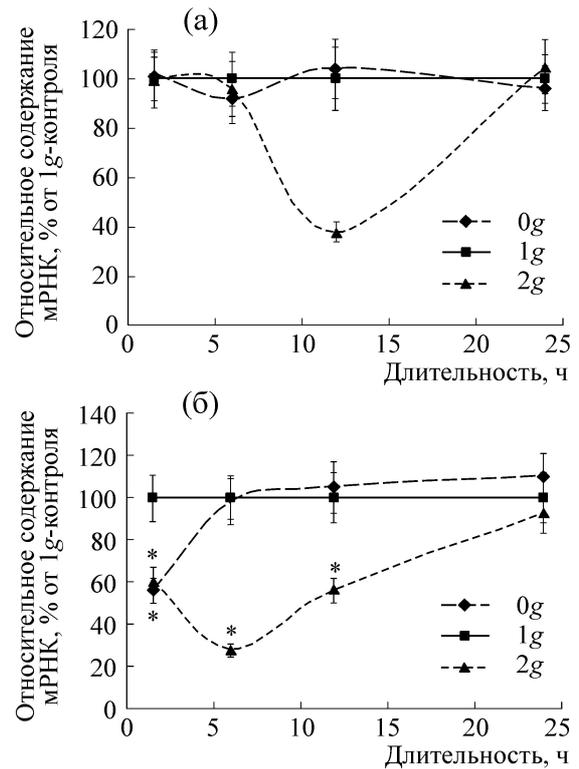
ствия мы отмечали и для мышечных клеток мышей [23], связывая эти изменения с деформацией и, как следствие, разрушением кортикального цитоскелета при изменении внешних механических условий. Восстановление его в гипергравитационных и невозможность в микрогравитационных условиях связаны, по-видимому, с запуском различных сигнальных путей, обусловленных прежде всего физиологической необходимостью «усиления» цитоскелета при увеличении внешнего механического напряжения и «избыточностью» – при его снижении.

В то же время содержание мРНК белков, связывающихся с мономерами актина менялось при этом по-разному – через 1,5–6 ч микрогравитации оно было снижено, а гипергравитации – повышено. Можно предположить, что это связано с разным характером разрушения кортикального цитоскелета – при переходе от 1g к 0g разрушается только актиновая сеть, но на таких коротких временах воздействия – не сами филаменты. Переход от 1g к 2g является более «травматичным» и цитоскелет разрушается вплоть до перехода F-актина в G-актин.

При этом изменения содержания мРНК генов, кодирующих белки, связывающиеся с филаментами актина, были принципиально различными. Так, содержание мРНК супервиллина практически не менялось, лишь несколько возросло через 24 ч гипергравитации, что представляется вполне закономерным, поскольку супервиллин – периферический мембранный белок, который связывает миозин II и F-актин в любой клетке, реорганизуя актиновый цитоскелет, и негативно регулирует стресс-фибриллы, фокально-адгезивные контакты и адгезию клеток на субстрате [34].

В то же время абсолютно разнонаправленную динамику демонстрировали содержание мРНК гена фимбрина и альфа-актинина. В микрогравитационных условиях содержание мРНК фимбрина падало (к 24 ч восстанавливалось), альфа-актинина – существенно росло к 12 ч воздействия, а через 24 ч уменьшалось до контрольного уровня. В гипергравитационных условиях, наоборот, содержание мРНК фимбрина сначала росло, а через 24 ч падало ниже контроля, тогда как содержание альфа-актинина было существенно снижено, а через 24 ч – превышало контрольный уровень.

Фимбрин – основной представитель белков одноименного семейства актинсвязывающих белков – является высококонсервативным в ряду эукариот и представлен в различных типах клеток [35]. В зависимости от уровня фосфорилирования он может связываться с F-актином



**Рис. 4.** Относительное содержание мРНК генов, кодирующих метаболические белки: (а) – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (*Gapdh*), (б) – цитохром *c* (*Cyt-c*); \* –  $p < 0,05$  по сравнению с группой 1g.

в подмембранном цитоскелете и выступать в качестве основного организатора трехмерной актиновой сети в клетке [36].

Полученные результаты коррелируют с нашими предыдущими данными, полученными на мышцах как в модельных экспериментах, так и после космического полета биоспутника «Бион-М» №1 (2013 г., Россия): при увеличении внешнего механического напряжения (силы тяжести) через 6 ч содержание альфа-актинина-1 снижается (а при уменьшении снижается содержание другой изоформы – альфа-актинина-4) в мембранной фракции белков, увеличиваясь в то же время в цитоплазматической фракции, и впоследствии (через 12 ч) снижается уровень экспрессии соответствующего гена [22–26]. Эти результаты позволили предположить, что изоформы альфа-актинина участвуют в акте первичной клеточной механорецепции.

Но принцип механизма первичной рецепции внешнего механического напряжения может быть универсальным для клеток различных, в том числе и эволюционно далеких друг от друга, организмов. Следует отметить, что изменений экспрессии гена фимбрина при изме-

нении внешних механических условий в мышечных клетках мышей мы не наблюдали [26]. Но поскольку у *Drosophila melanogaster* нет изоформы альфа-актинина-4, возможно, что его роль в клетке играет фимбрин, далее в эволюционном ряду «передавая» свою локализацию и, вероятно, одну из функций на альфа-актинин-4. Безусловно, подобное предположение является лишь гипотезой, которая нуждается в дополнительных экспериментах, в первую очередь – в условиях космического полета.

Известно, что альфа-актинин-4 взаимодействует с ядерными белками и, проникая в ядро, может регулировать экспрессию гена, кодирующего цитохром *c* [37]. Хотя для фимбрина, согласно доступным нам литературным источникам, подобной возможности не было продемонстрировано, мы решили, тем не менее, определить содержание мРНК гена цитохрома *c*. В гипергравитационных условиях содержание мРНК *Cyt-c* снижалось (хотя содержание мРНК *Fim* увеличивалось), но при этом снижалось и содержание мРНК *Gapdh*, восстанавливаясь до уровня контроля через 24 ч 2g-центрифугирования. В микрогравитационных условиях содержание мРНК *Cyt-c*, так же как и фимбрина, через 1,5 ч воздействия было снижено, восстанавливаясь до контроля через 6 ч (фимбрина – через 24 ч); при этом содержание мРНК *Gapdh* не менялось в течение всего периода воздействия.

Таким образом, можно выдвинуть гипотезу в качестве предпосылки для дальнейших исследований, что фимбрин в клетках *Drosophila melanogaster* связывает кортикальный цитоскелет с мембраной (а не только актиновые филаменты друг с другом) и способен регулировать экспрессию гена цитохрома *c*, передавая эти свои функции в клетках млекопитающих на возникающую у них новую изоформу альфа-актинина – альфа-актинин-4.

Авторы выражают искреннюю благодарность всем сотрудникам лаборатории клеточной физиологии ГНЦ РФ – ИМБП РАН и ее руководителю чл.-корр. РАН Л.Б. Буравковой за предоставленную возможность и оказанную помощь в проведении экспериментов с использованием RPM.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований ГНЦ РФ – ИМБП РАН и Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. N. Dubinin and E. Vaulina, *Life Sci. Space Res.* **14**, 47 (1976).
2. M. Ross, *Adv. Space Res.* **4**, 305 (1984).
3. M. G. Tairbekov, V. Klimovitskii, and V. S. Oganov, *Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol.* **5**, 517 (1997).
4. G. Albrecht-Buehler, *ASGSB Bull.* **5** (2), 3 (1992).
5. A. Cogoli, *J. Gravit. Physiol.* **3** (1), 1 (1996).
6. S. J. Pardo, M. J. Patel, M. C. Sykes, et al., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **288** (6), C1211 (2005).
7. J. G. Gershovich, N. A. Konstantinova, P. M. Gershovich, and L. B. Buravkova, *J. Grav. Physiol.* **14** (1), 133 (2007).
8. L. B. Buravkova, Yu. A. Romanov, N. A. Konstantinova, et al., *Acta Astronautica* **63**, 603 (2008).
9. P. M. Gershovich, J. G. Gershovich, and L. B. Buravkova, *J. Grav. Physiol.* **15** (1), 203 (2008).
10. D. Sakar, T. Nagaya, K. Koga, and H. Seo, *Cells Environmental Medicine*, **43** (1), 22 (1999).
11. B. M. Uva, M. A. Masini, M. Sturla, et al., *Brain Res.* **934**, 132 (2002).
12. S. Gaboyard, M. P. Blachard, B. T. Travo, et al., *NeuroReport* **13** (16), 2139 (2002).
13. P. A. Plett, R. Abonour, S. M. Frankovitz, and C. M. Orschell, *Exp. Hematol.* **32**, 773 (2004).
14. M. A. Kacena, P. Todd, and W. J. Landis, *In Vitro Cell Dev. Biol. – Animal* **39** (10), 454 (2004).
15. S. J. Crawford-Young, *Int. J. Dev. Biol.* **50** (2–3), 183 (2006).
16. H. Schatten, M. L. Lewis, and A. Chakrabari, *Acta Astronautica* **49** (3–10), 399 (2001).
17. M. Zayzafoon, W. E. Gathings, and J. M. McDonald, *Endocrinology* **145** (5), 2421 (2004).
18. V. E. Meyers, M. Zayzafoon, S. R. Gonda, et al., *J. Cell Biochem.* **93** (4), 697 (2004).
19. V. E. Meyers, M. Zayzafoon, J. T. Douglas, and J. M. McDonald, *J. Bone Miner. Res.* **20** (10), 1858 (2005).
20. Z. Q. Dai, R. Wang, S. K. Ling, et al., *Cell Prolif.* **40** (5), 671 (2007).
21. Z. Pan, J. Yang, C. Guo, et al., *Stem Cell Dev.* **17** (4), 795 (2008).
22. I. V. Ogneva, *J. Biomed. Biotechnol.* **2013**, Article ID 598461 (2013).
23. I. V. Ogneva, N. S. Biryukov, T. A. Leinsoo, and I. M. Larina, *PLoS One* **9** (4), e96395 (2014).
24. I. V. Ogneva, M. V. Maximova, and I. M. Larina, *J. Appl. Physiol.* **116** (10), 1315 (2014).
25. I. V. Ogneva, V. Gnyubkin, N. Laroche, et al., *J. Appl. Physiol.* **118**, 613 (2015).
26. I. V. Ogneva and N. S. Biryukov, *PLoS One* **11** (4), e0153650 (2016).
27. K. J. Livak and T. D. Schmittgen, *Methods* **25**, 402 (2001).
28. L. Cassimeris and J. Morabito, *Mol. Biol. Cell*, **15**, 1580 (2004).

29. F. Gergely, V. M. Draviam, and J. W. Raff, *Genes Dev.* **17**, 336 (2013).
30. K. M. Knee, O. A. Sergeeva, and J. A. King, *Cell Stress Chaperones* **18**, 137 (2013).
31. M. B. Yaffe, G. W. Farr, D. Miklos, et al., *Nature* **358**, 245 (1992).
32. S. Yokota, H. Yanagi, T. Yura, and H. Kubota, *Eur. J. Biochem.* **268**, 4664 (2001).
33. K.-A. Won, R. J. Schumacher, G. W. Farr, et al., *Mol. Cell Biol.* **18** (12), 7584 (1998).
34. J. L. Crowley, T. C. Smith, Z. Fang, et al., *Mol. Biol. Cell* **20** (3), 948 (2009).
35. K. Matsushima, M. Shiroo, H. F. Kung, and T. D. Copeland, *Biochemistry* **27**, 3765 (1988).
36. B. Janji, A. Giganti, V. De Corte, et al., *J. Cell Sci.* **119**, 1947 (2006).
37. S. Goffart, A. Franko, Ch. S. Clemen, and R. J. Wiesner, *Curr. Genet.* **49**, 125 (2006).

## Analysis of the Expression Level of Genes, Encoding Cytoskeletal Proteins, in *Drosophila melanogaster* Larvae under the Effects of Different Duration Micro- and Hypergravity Simulation

M.S. Kupriyanova\* \*\* and I.V. Ogneva\* \*\*

\*Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Khoroshevskoe shosse 76a, Moscow, 123007 Russia

\*\*Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, ul. Trubetskaya 8/2, Moscow, 119991 Russia

The aim of the study was to find the genes encoding cytoskeletal proteins in the fruit fly, which can potentially be candidates for the role of triggers in cell mechanosensitivity. Centrifugation was used to simulate the effects of hypergravity (group 2g) and the orientation of the larvae in the gravity field was constantly changing in order to simulate the effects of microgravity (group 0g) for 1.5, 6, 12 and 24 hours. mRNA levels in different genes encoding the components of tubulin and actin cytoskeleton were assessed by qRT-PCR. In group 0g the mRNA levels of beta-tubulin and *M.sps* were reduced after 1.5 hours of exposure and remained so until 12 hours and after 24 hours exceeded the control level. The mRNA level of chaperonin-containing T-complex 1 polypeptide subunit recovered earlier – in 6 and 12 hours under the condition of microgravity. At the same time, the impact of hypergravity led to more significant changes in the mRNA level of TCP1 complex components compared to those in tubulin and *M.sps*. The mRNA level of beta-actin isoforms under micro- and hypergravity decreased up to 12 hours of exposure, and then being under microgravity conditions it remained reduced, but under hypergravitational conditions it was restored (*Act87E*) and even exceeded (*Act57B*) the reference level. The mRNA level of supervillin was almost unchanged. Under microgravity conditions the mRNA level of fimbrin decreased (it was then reduced at the 24 hour time point), but the mRNA level of alpha-actinin significantly increased at the 12 hour time point of exposure and in 24 hours it was reduced to the control level. On the contrary, under hypergravitational conditions the mRNA level of fimbrin initially increased, and after 24 hours it dropped below the control and the mRNA level of alpha-actinin was significantly reduced, and after 24 hours it was higher than the reference level. Similar results were obtained in earlier experiments in rodents, but similar dynamics was observed for alpha-actinin isoforms 1 and 4, though no changes were seen for fimbrin. Since *Drosophila melanogaster* has no alpha-actinin isoform-4, it is hypothesized that instead of it fimbrin takes its place in the cell.

*Key words:* cell mechanosensitivity, microgravity, cytoskeleton, actin-binding proteins, tubulin-binding proteins, *Drosophila melanogaster*