

УДК 57.034:577.217.5+57.085.23

САМОСИНХРОНИЗАЦИЯ РИТМА СИНТЕЗА БЕЛКА В КУЛЬТУРАХ NaCaT КЕРАТИНОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА¹

© 2011 г. В. Я. Бродский, В. В. Терских, А. В. Васильев, Н. Д. Звездина, Е. А. Воротеляк, В. И. Фатеева, Л. А. Мальченко

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

E-mail: brodsky.idb@bk.ru

Поступила в редакцию: 31.05.10

Окончательный вариант получен: 17.06.10

В культурах кератиноцитов человека NaCaT, содержащихся в бессывороточной среде на стеклах, обнаружен окологосударственный ритм синтеза белка, сходный с ритмом в гепатоцитах *in vitro*. Интенсивность синтеза определяли по включению ³H-лейцина с поправкой на пул свободного меченого лейцина. Ритм изучали в отмытых 1- или 2-суточных культурах после смены среды. Среда, кондиционированная кератиноцитами NaCaT, синхронизировала разреженные несинхронные в контроле культуры гепатоцитов. Следовательно, кератиноциты выделяют в среду синхронизирующие факторы. Хелатор ионов кальция ВАРТА-АМ ликвидирует ритм синтеза белка как в плотных синхронных в контроле культурах гепатоцитов, так и в культурах кератиноцитов NaCaT. Аналогичным был эффект ингибитора протеинкиназ Н7. Таким образом, в кератиноцитах, как и в гепатоцитах, происходит самосинхронизация колебаний интенсивности синтеза белка. Механизм самосинхронизации – кальций-зависимое фосфорилирование клеточных белков.

Ключевые слова: прямые межклеточные взаимодействия, ритм синтеза белка, фосфорилирование белков, окологосударственные ритмы, кератиноциты, гепатоциты, клеточные культуры, ганглиозиды, мелатонин

ВВЕДЕНИЕ

Ранее нами выявлен механизм кооперации гепатоцитов *in vitro* и *in vivo* в формировании ритма синтеза белка (обзор: Brodsky, 2006). Ритм использовали как маркер прямых межклеточных взаимодействий, приводящих к самосинхронизации колебаний интенсивности синтеза белка. Сигнальными факторами, взаимодействующими с рецепторами клеточной мембраны и запускающими цепь процессов в цитоплазме, в наших опытах были ганглиозиды и трансмиттеры – норадреналин и серотонин, а также мелатонин. Как мишень действия сигнала определили внутриклеточный кальций, а ключевым процессом организации ритма синтеза белка оказалась активация протеинкиназ и, соответственно, фосфорилирование белков. Возник вопрос: только ли гепатоцитам свойственен протеинкиназный механизм организации ритма синтеза белка в клеточных популяциях?

Изучали перевиваемую культуру NaCaT кератиноцитов человека (Voucamp et al., 1988). NaCaT – линия иммортализованных клеток, не обладающих туморогенностью и инвазивностью. Взаимо-

действуют ли кератиноциты друг с другом, синхронизируя колебания синтеза белка, т.е. свойствен ли им общий популяционный ритм синтеза? При положительном ответе, каков механизм межклеточной кооперации: влияет ли на кинетику синтеза белка в кератиноцитах NaCaT блокада изменений цитоплазматического кальция и ингибирование протеинкиназ, как это наблюдали в культурах гепатоцитов?

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры. Линия NaCaT кератиноцитов кожи человека выделена более 20 лет назад (Voucamp et al., 1988). Клетки культивировали в среде DMEM (ПанЭко) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и глутамин (ПанЭКО), снимали смесью 0.25% трипсин-ЭДТА (Gibco). Пассировали раз в 3–5 дней в соотношении 1 : 4–1 : 6. Для целей наших опытов суспензию клеток переносили в бессывороточную среду (Бродский, Терских и др., 1996): среда 199 с 0.2 мг/мл альбумина для клеточных культур (Sigma) и 0.5 мкг/мл инсулина (Sigma); газовая фаза содержала 95% воздуха и 5% CO₂. Суспензию, содержащую 4–5 × 10⁶ клеток в 1 мл среды, вносили

¹ Авторы благодарят РФФИ за поддержку (проекты 09-04-00116, 08-04-00144, 09-04-12132).

в чашку Петри с 30 мл среды над стеклами, покрытыми коллагеном. Площадь каждого стекла примерно 1 cm^2 . Получали плотные культуры с близко расположенными клетками (рис. 1). Через сутки культуры отмывали и переносили в свежую среду.

Исследование кинетики синтеза белка. Пробы, по три стекла с культурами каждая, брали последовательно через 10 мин в течение 2–3 ч. Каждую пробу инкубировали отдельно в течение 10 мин при 37°C в среде с ^3H -лейцином (25–30 мкCi/мл, специфическая радиоактивность 70–100 Ci/ммоль). Культуры промывали холодной средой и для экстракции не включившегося в белки лейцина переносили в холодную 5% хлорную кислоту на 60 мин. Затем культуры промывали этиловым спиртом и белки растворяли гиамином (бензетониум гидроксид, Sigma). Радиоактивность лейцина в белках и в небелковой кислоторастворимой фракции измеряли в каждой культуре (на отдельном стекле), используя сцинтилляционный счетчик TRJ-CARB, модель 2810-TR фирмы Perkin Elmes. Рассчитывали относительное включение лейцина $I_{\text{сорт}}$ в белки с поправкой на пул свободного лейцина

$$I_{\text{сорт}} = I_i \times P_m / P_i \text{ (срм)},$$

где I_i – измеренное включение в определенной культуре, а $P_i = I_i + p_i$ – общая радиоактивность клеток культуры, p_i – радиоактивность свободного (не включившегося в белки) ^3H -лейцина в той же культуре, P_m – средняя радиоактивность всех культур данного опыта. В отношении $I_{\text{сорт}}$ нивелируются вариабельность пула свободного лейцина, а также различное число клеток в разных культурах. Детальнее метод изложен ранее (Brodsky et al., 1992, 2000).

Каждый опыт ставили на культурах, полученных из одной и той же суспензии клеток NaCaT. Условия использования ингибиторов отмечены при описании соответствующих опытов в тексте и подробнее в подписях к рисункам.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В культурах клеток NaCaT обнаружен ритм синтеза белка (рис. 2). В течение 160 мин обнаружены три периода колебаний интенсивности синтеза, нерегулярные, как обычно в околочасовых ритмах (обзор: Brodsky, 2006). Примечательное отличие клеток NaCaT от гепатоцитов *in vitro* – в огромном пуле не включившегося в белки ^3H -лейцина. В гепатоцитах радиоактивность пула свободного лейцина обычно 2–3 раза больше радиоактивности белков; иногда эти величины даже равны. В клетках NaCaT это отношение 12–15, т.е. относительное (к свободному пулу) включение лейцина в белки в этих клетках значительно ниже, чем в гепатоцитах. Основной вывод опыта рис. 2: клетки NaCaT самосинхронизируются в свежей

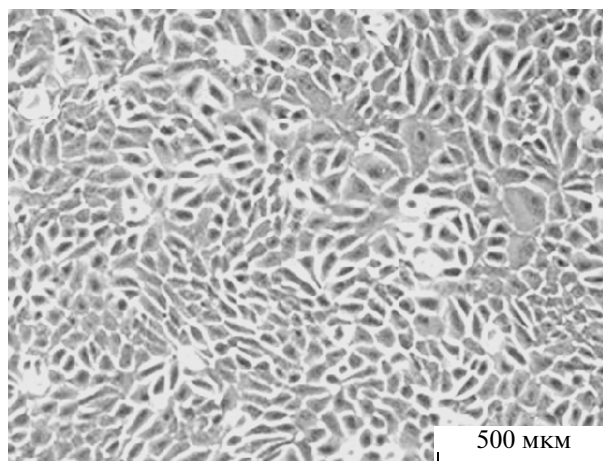


Рис. 1. Культура кератиноцитов человека (линия NaCaT).

бессывороточной среде и в результате формируются общий популяционный ритм синтеза белка.

Синхронизация активности клеток в пределах популяции может быть дистантной через среду или же прямой через клеточные контакты. В опи-

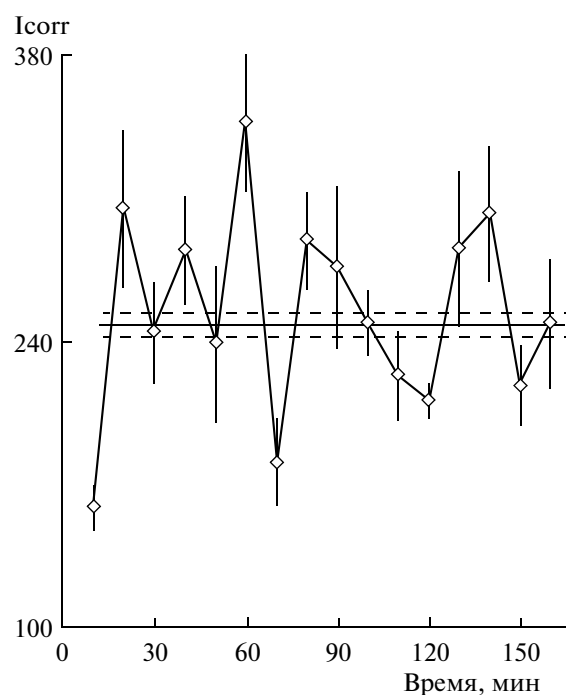


Рис. 2. Кинетика синтеза белка в суточных культурах кератиноцитов человека NaCaT. Суточные культуры отмывали и переносили в свежую бессывороточную среду. Через 30 мин, не меняя среду, каждые 10 мин брали пробы по 3 культуры и в течение 160 мин в каждой культуре отдельно исследовали кинетику синтеза белка; $I_{\text{сорт}}$ (срм) – включение ^3H -лейцина с поправкой на пул лейцина, не включившегося в белки (см. Методы). Прямая линия (здесь и на графиках рис. 3 и 4) – средний уровень синтеза белка для всех культур данного опыта, пунктир – ошибка этой средней.

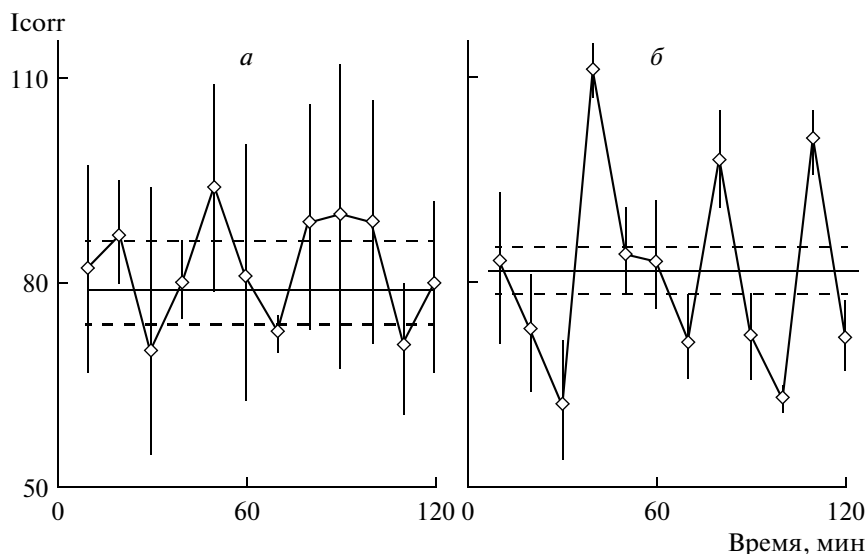


Рис. 3. Кинетика синтеза белка в суточных разреженных культурах гепатоцитов в свежей среде и в таких же культурах, содержащихся в среде, кондиционированной кератиноцитами HaCaT. Получение кондиционированной среды: суточные культуры HaCaT содержали в бессывороточной среде 20 часов, затем собрали среду, отцентрифугировали 3 мин при 1500g и налили в чашку с разреженными (в контроле несинхронными) культурами гепатоцитов: *a* – контроль, культуры гепатоцитов отмыли, перенесли в свежую среду и через 15 мин в течение следующих 120 мин исследовали кинетику синтеза белка; *б* – такие же культуры из той же суспензии гепатоцитов после отмытки перенесли в среду, кондиционированную HaCaT, и в этой среде в культурах исследовали кинетику синтеза белка.

санных нами межклеточных взаимодействиях в культурах гепатоцитов клетки выделяют в среду ганглиозиды, которые воспринимаются другими клетками той же популяции. Включается цепь процессов, приводящих к согласованной синхронной активности клеток. Другой возможный вариант межклеточных взаимодействий в плотном эпителиальном монослое – нерцепторный, путем перехода из клетки в клетку некоторого синхронизатора, который включает ту же или иную цепь процессов, приводящих к синхронизации клеток. Распространяющиеся через щелевые контакты волны кальция давно и хорошо описаны, но их влияние на какие-либо тканевые функции и, тем более, их синхронность пока не изучены.

Выделяют ли клетки HaCaT некие факторы, синхронизирующие ритм синтеза белка?

Ранее мы исследовали два типа культур гепатоцитов (Бродский и др., 1997; Brodsky et al., 2000). Плотные культуры с близко расположенными клетками быстро самосинхронизируются, что обосновывается обнаружением в них ритма синтеза белка практически сразу же после смены среды. В разреженных культурах с далеко отстоящими друг от друга клетками ритм долго не выявляется, т.е. такие культуры исходно не синхронны. В среде, кондиционированной плотными культурами, в разреженных культурах сразу выявлялся ритм синтеза белка. К тому же эффекту приводило добавление в свежую среду с разреженными культурами ганглиозидов или норадреналина, серотонина, ме-

латонина (см. также Бродский и др., 2006, 2008; Звездина и др., 2008).

Как и во всех предыдущих наших работах (ссылки выше), в отмытых суточных разреженных культурах гепатоцитов через 15 мин после смены среды ритм синтеза белка не был обнаружен (рис. 3). Если такие же культуры перенести после отмыкания в среду, кондиционированную 20 часов кератиноцитами HaCaT, в разреженных культурах гепатоцитов выявляется четкий ритм синтеза белка. Следовательно, кератиноциты выделяют в среду фактор (или факторы), синхронизирующий ритм синтеза белка.

Каков механизм синхронизации кератиноцитов при формировании общего популяционного ритма синтеза белка?

Как уже отмечалось, в культуре гепатоцитов эндогенным синхронизирующим сигнальным фактором являются ганглиозиды (Бродский и др., 1997; Звездина и др., 2000; Brodsky et al., 2000). Блокирование синтеза ганглиозидов, прекращение их выделения в среду останавливало синхронизацию клеток, что выражалось в ликвидации ритма синтеза белка в плотных в контроле синхронных культурах гепатоцитов (Brodsky et al., 2003). Аналогичные результаты получены при исследовании культур HaCaT.

Для блокирования синтеза ганглиозидов в клетках HaCaT использовали PPPP – [d-1-трео-1-фенил-2-гексадекананоиламино-3-пирролидино-1-пропанол-HCL] (Li, Ladisch, 1996; Olshefski, La-

disch, 1998), ингибитор гликозил-церамид синтазы, ключевого фермента синтеза ганглиозидов. По данным авторов препарата и нашим наблюдениям, действие PPPP обратимо. В первые часы после обработки культур ингибитором в среде практически не остается ганглиозидов.

В контрольных 2-суточных культурах кератиноцитов NaCaT, содержащихся все время в нормальной среде, выявлен четкий ритм синтеза белка с двумя периодами в течение 2 ч наблюдений (рис. 4). После блокады синтеза ганглиозидов ритм не обнаруживается: все точки графика входят в пределы средней интенсивности синтеза белка для всего опыта и ошибки этой средней. Если в среду с такими же культурами после PPPP добавить на 5 мин 5 нМ мелатонина, ритм синтеза белка восстанавливается. Размах колебаний заметно меньше, чем в контроле, но максимумы 30, 70 и 120 мин достоверно и значительно выше соответствующих минимумов.

Из наших опытов с блокированием синтеза ганглиозидов следует, что ганглиозиды являются единственным адекватным эндогенным фактором самосинхронизации клеток NaCaT, как и гепатоцитов. Действительно, если бы клетки NaCaT или гепатоциты выделяли в среду, кроме ганглиозидов, еще и другие синхронизаторы, например, норадrenalин или мелатонин, ритм синтеза белка после действия PPPP выявлялся бы.

В следующем опыте (рис. 5) исследовали влияние блокирования изменений уровня свободного кальция в цитоплазме или ингибирования активности протеинкиназ на кинетику синтеза белка в суточных культурах, полученных из одной суспензии кератиноцитов NaCaT. Вариантом контроля в этом опыте было действие мелатонина на кератиноциты. В контрольных культурах, как и ранее, наблюдали ритм синтеза белка. Более высокий уровень синтеза белка и значительно больший размах его колебаний наблюдали после воздействия на такие же нормальные культуры мелатонина. Подобные эффекты мы наблюдали и после воздействия мелатонина на гепатоциты (Бродский и др., 2008, 2009, 2010а, б). Блокирование изменений внутриклеточного кальция хелатором ВАРТА-АМ ликвидировало ритм синтеза белка в кератиноцитах: все 12 временных точек были в пределах среднего для всего опыта синтеза с ошибкой. Также и подавление активности протеинкиназ ингибитором Н7 — [1-(5-изохинолинсульфонил)-5-метилпиперазин дигидрохлорид] ликвидировало ритм в культурах кератиноцитов NaCaT.

Основной вывод опыта с блокированием кальция и протеинкиназ: самосинхронизация ритма синтеза белка в кератиноцитах NaCaT осуществляется тем же способом, что в гепатоцитах. Синхронизация клеток в обоих случаях зависит от увеличения концентрации ионов кальция в цитоплазме

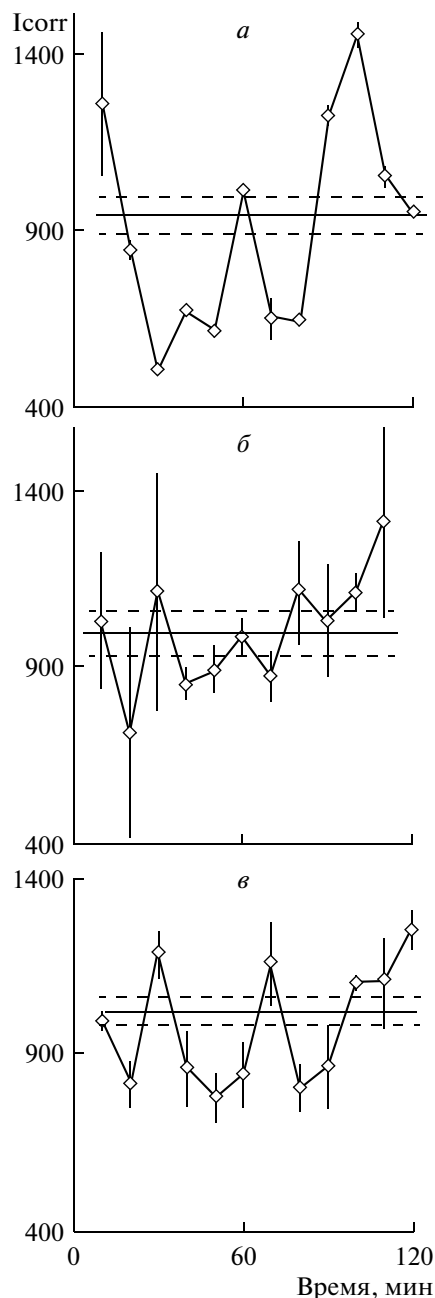


Рис. 4. Кинетика синтеза белка в двухсуточных культурах NaCaT после блокирования синтеза ганглиозидов: *а* — контроль, культуры инкубировали сутки в нормальной бессывороточной среде; затем культуры отмывали и инкубировали еще сутки; двухсуточные культуры отмывали, сменили среду, через 35 мин еще раз отмывали, сменили среду и через 20 мин, не меняя среду, в культурах исследовали кинетику синтеза белка; *б* — суточные отмывые культуры NaCaT инкубировали сутки в среде с ингибитором синтеза ганглиозидов — PPPP (1.5 мкМ); затем культуры отмывали и перенесли в свежую среду без PPPP; через 35 мин культуры вновь отмывали и через 20 мин, не меняя среду, в культурах исследовали кинетику синтеза белка; *в* — культуры, сутки предобработанные PPPP, отмывали и перенесли в среду без PPPP, через 30 мин в среду внесли мелатонин в конечной концентрации 5 нМ на 5 мин, затем культуры отмывали и через 20 мин, не меняя среду, в этих культурах исследовали кинетику синтеза белка.

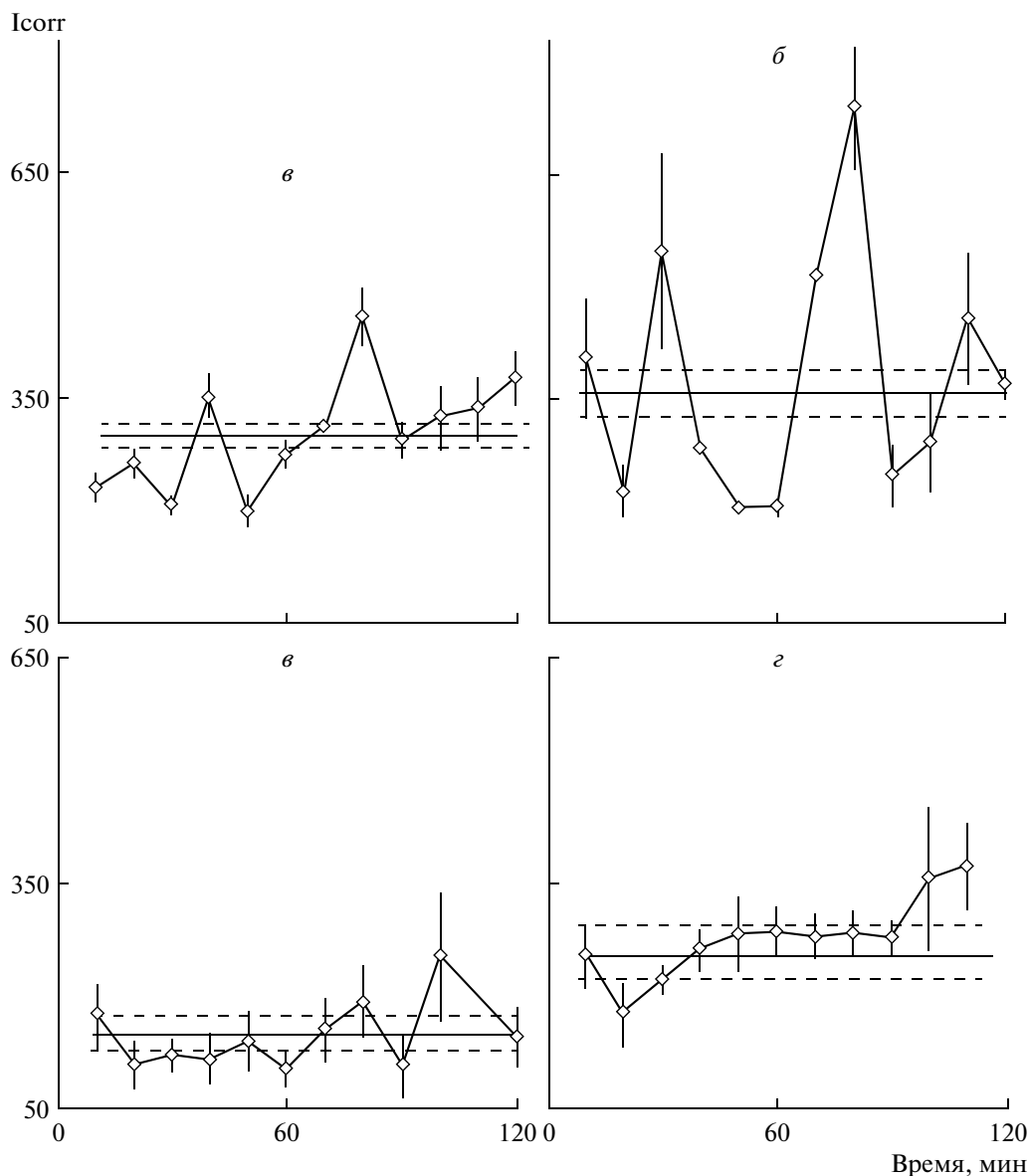


Рис. 5. Кинетика синтеза белка в суточных культурах NaCaT после действия мелатонина, хелатора кальция ВАРТА-АМ или ингибитора протеинкиназ Н7: *a* – контроль, отмытые культуры инкубировали в нормальной среде 60 мин, еще раз отмыли и через 15 мин, не меняя среду, исследовали кинетику синтеза белка; *б* – в среду отмытых культур через 55 мин внесли мелатонин в конечной концентрации 5 нМ на 5 мин, затем культуры отмыли и через 15 мин, не меняя среду, исследовали кинетику синтеза белка; *в* – отмытые культуры перенесли на 60 мин в среду с 20 мкМ хелатора цитоплазматического кальция ВАРТА-А, затем культуры отмыли, перенесли в чистую свежую среду и через 15 мин, не меняя среду, исследовали кинетику синтеза белка; *г* – отмытые суточные культуры перенесли на 60 мин в среду с 40 мкМ ингибитора протеинкиназ Н7, затем культуры отмыли и через 15 мин, не меняя среду, исследовали кинетику синтеза белка.

и активации протеинкиназ (Бродский и др., 2002, 2006; Звездина и др., 2003). Ингибитор Н7 действует в основном на кальций-зависимую протеинкиназу С. В гепатоцитах мы индуцировали ритм синтеза белка форбол 12-мирикат 13-ацетатом, который активирует главным образом протеинкиназу С. Но ритм индуцировал и форсколин, который активирует цАМФ-зависимую протеинкиназу А. Отметим, что ранее мы нашли окологасовой ритм цАМФ (Ярыгин и др., 1979) и такой же

ритм АТФ (Brodsky et al., 1992). Таким образом, основное событие организации ритма синтеза – фосфорилирование белков, которое, очевидно, может осуществляться различными протеинкиназами, хотя основными являются кальций-зависимые ферменты. Какие именно белки фосфорилируются, пока не известно.

Фосфорилирование белков синхронизирует окологасовые ритмы и в некоторых других клетках, кроме гепатоцитов и кератиноцитов. Так, в ра-

ботах лаборатории Гилберта и Хэммонд (Bhoola and Hammond, 2000; Calvert-Evers and Hammond, 2000; Hammond et al., 2000), проведенных одновременно с нашими исследованиями сигнальных факторов-агонистов кальция, нашли ритм активности нескольких ферментов после фосфорилирования белков эритролейкемических клеток *in vitro*. Авторы не изучали влияния кальция и протеинкиназ. Они оценивали фосфорилирование белков по метке ^{32}P . После введения в культуральную среду инсулина или ретиноевой кислоты уровень фосфорилированных белков существенно повышался и колебания активности изученных ферментов синхронизировались. Среди выявленных околочасовых ритмов были ритмы тирозиновой протеинкиназы и фосфатазы.

Цепь процессов, приводящих к фосфорилированию белков, включается через рецепторы сигнальных факторов. Блокирование рецепторов норадреналина ликвидировало индуцирующее ритм синтеза белка действие этого трансммиттера (Звезда и др., 2008). Особенно ярко зависимость от состояния рецепторов проявлялась в случае мелатонина. В отличие от норадреналина, мелатонин легко проникает в клетку через плазматическую мембрану (Sjoblom et al., 2003; Кветная и др., 2005; Анисимов, 2008). Тем не менее, блокирование рецепторов мелатонина в гепатоцитах лузиндолом ликвидировало синхронизирующий эффект мелатонина (Бродский и др., 2009).

Обратимое фосфорилирование-дефосфорилирование – распространенный механизм изменения активности ферментов и, соответственно, функционального состояния клеток (Lehninger, 1982; Marks, 1996; Carlson, 2004). При изучении кератиноцитов, также как гепатоцитов, нами показано участие фосфорилирования в самосинхронизации клеточных популяций, в организации кинетики синтеза белка. Среди сигнальных факторов, стимулирующих эту функцию в гепатоцитах, мы определили трансммиттеры. Известно, что трансммиттеры – норадреналин, серотонин и дофамин – организуют (в образовании колоний) и бактерии (Олескин и др., 1998; Олескин, 2001; Freestone et al., 2007). Среди сигнальных факторов трансммиттерной природы, влияющих на развитие, обнаружен серотонин, выделяемый нейронами эмбриона и влияющий на организацию дефинитивного нервного органа (Ugrumov, 2002; Pronina et al., 2003; Mirochnik et al., 2005). Воронежская с соавторами (Voronezhskaya et al., 2004) показала, что трансммиттеры влияют на темп развития личинок некоторых беспозвоночных. Первичная организующая клеточные популяции функция трансммиттеров может быть одним из механизмов эволюции многоклеточных (Brodsky, Lloyd, 2008; Бродский, 2009).

Прямые межклеточные взаимодействия могут дополнять центральные регуляции в физиологии. Это было обосновано опытами с денервацией печени (Бродский и др., 1995), после чего на срезах печени и в культурах гепатоцитов был определен ритм синтеза белка, в этом случае, результат межклеточной кооперации *in vivo* и *in vitro*. Синтез специфических белков (плазмы крови, ферментов детоксикации и др.) – основная функция печени. Кинетика этой функции, по нашим данным, определяется прямыми межклеточными взаимодействиями, причем их механизм – кальций-протеинкиназный – сходен, по новым данным, с механизмом в других изученных клетках. Всегда ли используется такая регуляция или возможны и иные пути организации клеточных популяций? Что, например, определяет околочасовой ритм дыхания клеток? Интересные данные относятся к влияниям на некоторые звенья цикла Кребса (Lloyd, Murray, 2005; Lloyd, 2005, 2006). Влияние фосфорилирования белков этими работами не исключается. Анализ различных околочасовых ритмов в метаболизме дрожжей (Kippert, 2001) привел к выводу об участии в организации таких ритмов MAP-киназ и cAMP-зависимой протеинкиназы А. Наши наблюдения участия протеинкиназы А (как и других протеинкиназ) в организации ритма синтеза белка отмечены выше, также как и данные об околочасовом ритме цАМФ и АТФ. Сведения литературы, как и наши опыты, приводят к перспективе изучения продуктов, выделяемых клетками в среду на организацию межклеточной кооперации в физиологических функциях.

Изучение состава межклеточной среды продуктивно в решении многих проблем биологии развития и медицины. Так, стоит углубить данные о снижении уровня межклеточных взаимодействий вследствие изменений свойств межклеточной среды у старых животных (Бродский и др., 2005). Возможно, наиболее существенный результат этой работы – выяснение возможности усилить кооперацию клеток старых животных, меняя свойства межклеточной среды. Введение в сыворотку крови старых крыс ганглиозидов повышало показатели синтеза белка в гепатоцитах старых крыс до уровня молодых животных.

Процессы развития и регенерации регулируются множеством сигнальных факторов, среди которых выделяются факторы роста и транскрипционные факторы. Лишь в редких случаях известно, какие именно клетки выделяют такие факторы. Так, при трансдифференцировке пигментного эпителия тритона процесс зависит от фактора роста (FGF2), выделяемого клетками сосудистого слоя и влияющего на дедифференцировку и преобразование пигментного эпителия в клетки сетчатки (Susaki, Chiba, 2007; Авдонин и др., 2008). Выяснение вклада фосфорилирования-дефосфорилирования белков в механизмы действия факторов ро-

ста — существенная задача. Другая задача — дальнейшее изучение участия трансмиттеров и их производных в процессах развития и регенерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Авдонин П.П., Маркитантова Ю.В., Зиновьева Р.Д., Миташов В.И. Исследование экспрессии регуляторных факторов Pax6, Otx2, Six3, FGF2 в ходе регенерации у тритонов // Известия АН (Сер. Биол.). 2008. № 4. С. 355–361.
- Анисимов В.Н. Эпифиз, биоритмы и старение организма // Успехи физиол. наук. 2008. Т. 39. № 4. С. 52–76.
- Бродский В.Я. Прямые межклеточные взаимодействия и социальное поведение клеток млекопитающих, протистов и бактерий. Возможные причины многоклеточности // Онтогенез. 2009. Т. 40. № 2. С. 97–111.
- Бродский В.Я., Дубовая Т.К., Нечаева Н.В., Фатеева В.И., Новикова Т.Е. Ритм синтеза белка в денервированной печени // Известия АН (Сер. Биол.). 1995. № 2. С. 133–137.
- Бродский В.Я., Терских В.В., Нечаева Н.В., Новикова Т.Е., Гвазава И.Г., Фатеева В.И. Бессывороточная среда, сохраняющая нормальную морфологию и высокий уровень синтеза белка в гепатоцитах *in vitro* // Известия АН. 1996. № 4. С. 398–401.
- Бродский В.Я., Нечаева Н.В., Звездина Н.Д., Новикова Т.Е., Гвазава И.Г., Фатеева В.И. Синхронизация ритма синтеза белка в культурах гепатоцитов происходит при кондиционировании среды с накоплением ганглиозида GM1 в клетках: Иммуноцитохимическое исследование // Известия АН (Сер. Биол.). 1997. № 4. С. 389–399.
- Бродский В.Я., Нечаева Н.В., Звездина Н.Д., Авдонин П.В., Новикова Т.Е., Гвазава И.Г., Фатеева В.И. Изменения концентрации ионов кальция и ритм синтеза белка в культуре гепатоцитов // Известия АН. 2002. № 1. С. 10–16.
- Бродский В.Я., Нечаева Н.В., Звездина Н.Д., Новикова Т.Е., Гвазава И.Г., Фатеева В.И., Мальченко Л.А. Возрастные особенности ритма синтеза белка в гепатоцитах. Влияние межклеточной среды // Онтогенез. 2005. № 1. С. 9–17.
- Бродский В.Я., Звездина Н.Д., Фатеева В.И., Мальченко Л.А. Механизм прямых межклеточных взаимодействий. Самоорганизация ритма синтеза белка // Онтогенез. 2006. № 5. С. 384–393.
- Бродский В.Я., Голиченков В.А., Звездина Н.Д., Дубовая Т.К., Фатеева В.И., Мальченко Л.А., Бурлакова О.В., Беспятовых А.Ю. Мелатонин усиливает синтез белка и синхронизирует ритм синтеза в культурах гепатоцитов старых крыс // Онтогенез. 2008. № 6. С. 443–447.
- Бродский В.Я., Голиченков В.А., Звездина Н.Д., Фатеева В.И., Мальченко Л.А. Мелатонин синхронизирует ритм синтеза белка в культурах гепатоцитов как агонист внутриклеточного кальция и протеинкиназ // Онтогенез. 2009. № 3. С. 231–236.
- Бродский В.Я., Рапопорт С.И., Дубовая Т.К., Звездина Н.Д., Фатеева В.И., Мальченко Л.А. Мелатонин, введенный крысам внутрибрюшинно, эффективно синхронизирует ритм синтеза белка в первичных культурах гепатоцитов // Онтогенез. 2010а. № 2. С. 101–106.
- Бродский В.Я., Дубовая Н.Д., Звездина Н.Д., Фатеева В.И., Мальченко Л.А. Мелатонин модифицирует ритм синтеза белка // Бюлл. Эксп. Биол. Мед. 2010. Т. 149. № 1. С. 45–48.
- Звездина Н.Д., Грачева Е.В., Голованова Н.К., Проказова Н.В., Нечаева Н.В., Гвазава И.Г., Фатеева В.И., Бродский В.Я. Накопление ганглиозида GM1 в среде, кондиционированной культурой гепатоцитов крысы // Известия АН (Сер. Биол.) 2000б. № 1. С. 405–412.
- Звездина Н.Д., Нечаева Н.В., Грачева Е.В., Новикова Т.Е., Гвазава И.Г., Фатеева В.И., Мальченко Л.А., Бродский В.Я. Нарушение кооперации гепатоцитов в ритме синтеза белка хелатором цитоплазматического кальция ВАРТА-АМ // Известия АН. 2003. № 1. С. 14–19.
- Звездина Н.Д., Мальченко Л.А., Фатеева В.И., Бродский В.Я. Сигнальные факторы саморганизации ритма синтеза белка в культурах гепатоцитов — ганглиозиды и катехоламины — функционируют независимо друг от друга // Онтогенез. 2008. № 3. С. 198–207.
- Кветная Т.В., Князькин И.В., Кветной И.М. Мелатонин — нейроэндокринный маркер возрастной патологии. СПб.: ДЕАН, 2005.
- Олескин А.В. Биополитика. М.: МГУ, 2001.
- Олескин А.В., Кировская Т.А., Ботвинко И.В., Лысак Л.В. Действие серотонина (5-окситриптамина) на рост и дифференцировку организмов. Микробиология. 1998. 67. № 3. 305–312.
- Ярыгин К.Н., Нечаева Н.В., Фатеева В.И., Новикова Т.Е., Бродский В.Я. Околочасовой ритм концентрации цАМФ в срезах околушной железы крысы // Бюлл. Эксп. Биол. Мед. 1979. № 12. С. 711–712.
- Bhoola R., Hammond K. Modulation of the rhythmic patterns of expression of phosphoprotein phosphatases in human leukaemia cells // Cell Biology International 2000. V. 24. P. 539–547.
- Boucamp P., Petrussevska R.T., Breikretz D., Markham A., Fusenig N.E. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line // J. Cell Biol. 1988. V. 106. P. 761–771.
- Brodsky V.Y. Direct cell–cell communication. A new approach derived from recent data on the nature and self-organization of ultradian (circahoralian) intracellular rhythms // Biological Reviews of Cambridge Philosophical Soc. 2006. V. 82. P. 143–162.
- Brodsky V.Y., Lloyd D. Self-organized intracellular ultradian rhythms provide direct cell–cell communication. In: Ultradian rhythms from molecules to mind. Springer, 2008. P. 85–104.
- Brodsky V.Y., Boikov P.Y., Nechaeva N.V., Yurovitsky Y.G., Novikova T.E., Fateeva V.I., Shevchenko N.A. The rhythm of protein synthesis does not depend on oscillations of ATP level // J. Cell Science. 1992. V. 103. P. 363–370.
- Brodsky V.Y., Nechaeva N.V., Zvezdina N.D., Prokazova N.V., Golovanova N.K., Novikova T.E., Gvasava I.G., Fateeva V.I. Gangliodide-mediated synchronization of the protein synthesis rhythm in cultured hepatocytes // Cell Biology International 2000. V. 24. P. 211–222.

- Brodsky V.Y., Zvezdina N.D., Nechaeva N.V., Novikova T.E., Gvasava I.G., Fateeva V.I., Gracheva H.* Loss of the hepatocyte co-operative activity after inhibition of ganglioside synthesis and shedding // *Cell Biology International*. 2003. V. 27. P. 935–942.
- Calvert-Evers J.L., Hammond K.D.* Temporal variations in protein tyrosine phosphatase activity during cell proliferation and differentiation // *Cell Biology International* 2000. V. 24. P. 559–567.
- Carlson B.M.* Human embryology and developmental biology. Mosby. Elsevier. Philadelphia. 2004.
- Freestone P.P.E., Haigh R.D., Lyte M.* Specificity of catecholamine-induced growth in *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica* // *FEMS Microbiol. Lett.* 2007. V. 269. P. 221–228.
- Hammond K.D., Bhoola R., Bodalina U., Gilbert, D.A.* Dynamic cells: Temporal organisation and control of phosphorylation // *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology*. 2000. V. 4. P. 75–88.
- Kippert F.* Cellular signaling and the complexity of biological timing: insights from the ultradian clock of *Schizosaccharomyces pombe* // *Phil. Trans. Royal Soc. London*. 2001. V. 356. P. 1725–1733.
- Lehninger A.L.* Principles of biochemistry. NY. Worth. 1982.
- Li R., Ladisch S.* Abrogation of shedding of immunosuppressive neuroblastoma gangliosides // *Cancer Res.* 1996. V. 56. P. 4602–4605.
- Lloyd D.* Systems dynamics in biology // *J. Appl. Med.* 2005. V. 3. P. 1–12.
- Lloyd D.* Ultradian rhythms and clocks in plants and yeast // *Biol. Rhythms Res.* 2006. V. 37. P. 281–297.
- Lloyd D., Murray D.B.* Ultradian metronome: timekeeper for orchestration of cellular coherence // *Trends Biochem. Sci.* 2005. V. 30. P. 373–377.
- Marks F.* Protein phosphorylation. Wiley InterScience. 1996.
- Mirochnik V., Bosler O., Calas A., Ugrumov M.* Long-lasting effects of serotonin deficiency on differentiating peptidergic neurons in the rat suprachiasmatic nucleus // *Int. J. Develop. Neurosci.* 2005. V. 23. P. 85–91.
- Olshefski R., Ladisch S.* Synthesis, shedding, and intracellular transfer of human medulloblastoma gangliosides: abrogation by a new inhibitor of glycosylceramide synthase // *J. Neurochem.* 1998. V. 70. P. 467–472.
- Pronina T., Adamskaya E., Ugrumov M., Kuznetsova T., Shishkina I., Babichev V., Calas A., Tramu G., Maily P., Makarenko I.* Influence of serotonin on the development and migration of gonadotropin-releasing hormone neurons in rat fetuses // *J. Neuroendocrinol.* 2003a. V. 15. P. 549–558.
- Pronina T., Ugrumov M., Calas A., Seif I., Tramu G.* Influence of monoamine of differentiating gonadotropin-releasing hormone neurons in foetal mice // *J. Neuroendocrinol.* 2003b. V. 15. P. 925–932.
- Sjoblom M., Safsten B., Flemstrom G.* Melatonin-induced calcium signaling in clusters of human and rat duodenal enterocytes // *Am. J. Physiol.* 2003. V. 284. P. G1034–1044.
- Susaki K., Chiba C.* MEK mediates in vitro neural transdifferentiation of the adult newt retinal pigment epithelium cells: Is FGF2 an induction factor? // *Pigment Cell Res.* 2007. V. 20. P. 364–379.
- Ugrumov M.V.* Magnocellular vasopressin system in ontogenesis: Development and regulation // *Microsc. Res. Tech.* 2002. V. 56. P. 164–171.
- Voronezhskaya E.E., Khabarova M.Yu., Nezlin L.P.* Apical sensory neurons mediate developmental retardation induced by conspecific environmental stimuli in freshwater pulmonate snails // *Development*. 2004. V. 131. P. 3671–3680.

Self-Synchronization of the Protein Synthesis Rhythm in HaCaT Cultures of Human Keratinocytes

V. Ya. Brodskii, V. V. Terskikh, A. V. Vasilyev, N. D. Zvezdina, E. A. Vorotelyak, V. I. Fateeva, and L. A. Mal'chenko

Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia
e-mail: brodsky.idb@bk.ru

Abstract—In cultures of human keratinocytes HaCaT contained in a serum-free medium on glass, a circadian rhythm of protein synthesis was found similar to the one in hepatocytes in vitro. The intensity of the synthesis was determined by the inclusion of ³H-leucine corrected for the pool of free marked leucine. Rhythm was studied in washed 1- or 2-day cultures after the change of the medium. The medium conditioned with keratinocytes HaCaT synchronized the rarefied hepatocyte cultures nonsynchronous in the control. Therefore, the keratinocytes liberate synchronizing factors into the medium. A BAPTA-AM chelator of calcium ions eliminates the protein synthesis rhythm both in dense hepatocyte cultures synchronous in the control and in the HaCaT keratinocyte cultures. The effect of the H7 inhibitor of protein kinases was analogous. Thus, both in keratinocytes and hepatocytes, self-synchronization of fluctuations of the intensity of protein synthesis takes place. The mechanism of self-synchronization is the calcium-dependence of phosphorylation of cell proteins.

Keywords: direct cell-to-cell communication, rhythm of protein synthesis, phosphorylation of proteins, circadian rhythms, keratinocytes, hepatocytes, cell cultures, gangliosides, melatonin