

**ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ И СООБЩЕНИЙ,
ПРЕДСТАВЛЕННЫЕ НА II СЪЕЗД ОБЩЕСТВА КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ
СОВМЕСТНО С ЮБИЛЕЙНОЙ КОНФЕРЕНЦИЕЙ,
ПОСВЯЩЕННОЙ 50-ЛЕТИЮ ИНСТИТУТА ЦИТОЛОГИИ РАН**

(Санкт-Петербург, 16—19 октября 2007 г.)

СВЯЗЬ ООЦИТОВ СЦИФОМЕДУЗЫ *Aurelia aurita* (Cnidaria) С ЭКТОДЕРМОЙ ОБЕСПЕЧИВАЕТСЯ СТРУКТУРОЙ, СОДЕРЖАЩЕЙ МЕЗОГЛЕИН. © Л. С. Адонин, Т. Г. Шапошникова. Кафедра цитологии и гистологии С.-Петербургского государственного университета, matrix.evo@gmail.com.

В составе мезоглеи сцифомедузы *Aurelia aurita* присутствует белок с мол. массой 45/47 кДа. Клонирование мРНК белка и сравнение последовательности гипотетического белка с последовательностями, представленными в базах данных, показали, что это новый белок. Ему было присвоено название мезоглеин (Матвеев, настоящие тезисы). Анализ доменной структуры показал, что мезоглеин относится к суперсемейству ZP-доменсодержащих белков (Jovine et al., 2005). Экспрессию мезоглеина определяли в эпидерме, гастродерме и мезоглеальных клетках методом ОТ-ПЦР. ПЦР-продукт ожидаемого размера наблюдался только в реакциях с РНК из мезоглеальных клеток. Однако ранее методом иммуноблота с антителами RA45/47, полученными против мезоглеина, было показано, что структуры, содержащие антигены, выявляются как в мезоглеальных клетках, так и в клетках эпидермы. Задачей настоящей работы являлось выявление мезоглеина на ранних стадиях формирования сцифомедузы *A. aurita* с помощью антител RA45/47. Последовательное развитие ооцитов *A. aurita* происходит в нижней части желудка и внутренней части ротовых щупалец, где образуются углубления, названные выводковыми мешочками. Прикрепление развивающегося ооцита к эпидермальному слою клеток происходит за счет структур, в составе которых выявляется мезоглеин. Структура, окрашиваемая RA45/47, ранее описана не была. Ооциты появляются в толще эктодермы и вначале почти не отличаются от окружающих клеток (размер ооцита 5—10 мкм). По мере роста ооцита слой окружающих эпидермальных клеток утолщается и становится многослойным. На самых ранних этапах развития ооцита, когда он еще практически неотличим от близлежащих клеток в толще эпидермального пласта, в его периферической цитоплазме появляются гранулы, связывающие антитела RA45/47. Ядро ооцита на данной стадии располагается в центре клеток. По мере роста и созревания происходят «выделение» ооцита из эпидермального слоя клеток и потеря контакта с базальной мембраной

эпителия. Размер ооцита на данном этапе не превышает 20—25 мкм. При этом сохраняется связь между участком плазматической мембраны ооцита и клетками эпидермы. В этот период развития в месте контакта ооцита с эпидермальными клетками появляется интенсивно окрашенная RA45/47 гранулярная структура, окруженная менее ярким гомогенным веществом. Также нарушается центрическое положение ядра, оно смещается к полюсу, который обращен к структуре, прикрепляющей ооцит к эпидерме. Когда ооциты достигают 70—100 мкм в диаметре, в месте контакта с эпидермисом появляется гомогенная неклеточная структура с вкраплениями более интенсивно прокрашенных антителами RA45/47 гранул. Структура сохраняется до поздних стадий созревания ооцита, прикрепленного к эпителию. Гранулы, связывающие антитела против мезоглеина, выявляются также в апикальной части окружающих ооциты эпидермальных клеток ротовых лопастей. Недавно у другого представителя кишечнорастных — гидры — были обнаружены кормящие клетки, которые происходят из интерстициальных клеток (Alexandrova et al., 2005). Мы планируем показать, что и у сцифоидных есть специальные структуры, обеспечивающие питание и рост ооцита.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-49578-а).

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ДИСКА ИНТЕРКАЛЯРНОГО ГЕТЕРОХРОМАТИНА 75C1-2 ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ *Drosophila melanogaster*. © Н. Г. Ананько, Е. Б. Козола, Е. С. Беляева, И. Ф. Жимулев. Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, anata@bionet.nsc.ru.

У политенных хромосом *Drosophila melanogaster* существует около ста дисков интеркалярного гетерохроматина (ИГХ). Для них характерна репликация ДНК во второй половине S-фазы, которая приводит к недорепликации ДНК. Недорепликация выражается в том, что в политенных хромосомах образуются разломы и эктопические контакты. Белок SUUR локализуется в дисках ИГХ, а при его отсутствии эти районы политенизируются полностью. Для изучения внутренней организации индиви-

дуального диска ИГХ 75C1-2 мы определили его положение на молекулярной карте хромосомы 3L *D. melanogaster*. Для этого мы проводили цитологический анализ делеций с точно известным положением точек разрыва и гибридизацию *in situ* на политенных хромосомах ДНК-зондов из района 75C1-2. Известно, что при кратковременной эктопической экспрессии гена *SuUR* в составе конструкции *UAS—SuUR* под контролем драйвера *Sgs3-Gal4* на политенных хромосомах именно в районе интеркалярного гетерохроматина возникают необычные вздутия (пузыри). Мы показали, что делеции разных частей диска не предотвращают возникновения пузыря, хотя и влияют на его размер. Подсчет частот разломов хромосом в диске 75C1-2 с различными делециями показало, что возникновение разлома зависит главным образом от наличия дистальной части диска. Как было показано с помощью количественного Саузерн-блот-анализа, эта область соответствует зоне максимальной недорепликации ДНК. После введения двух дополнительных копий гена *SuUR* частота разломов в целом диске 75C1-2 значительно увеличивалась, тогда как в линиях *D. melanogaster*, несущих делеции дистальной части диска 75C1-2, количество разломов практически не изменилось. Сравнение профилей репликации диска 75C1-2 в линии *D. melanogaster* дикого типа и в линии, несущей четыре копии гена *SuUR*, показало, что дополнительные дозы белка SUUR, по-видимому, способствуют расширению зоны недорепликации в диске. Таким образом, белок SUUR связывается по всей длине диска 75C1-2 и при гиперэкспрессии вызывает образование пузыря из всего материала диска. Однако на недорепликацию ДНК SUUR влияет в основном только в дистальной части диска. С помощью количественного Саузерн-блот-анализа мы показали, что удаление дистальной половины диска 75C1-2 приводит к увеличению уровня политенизации оставшегося материала в 1.4—1.5 раза в зависимости от того, какой эухроматиновый участок окажется на месте удаленной части диска. Это позволяет предполагать, что в дистальной части диска 75C1-2 могут находиться последовательности, препятствующие репликации ДНК.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДВОЙНЫХ МУТАНТОВ *SuUR Su(var)3-9* ДЛЯ ДЕТАЛЬНОГО КАРТИРОВАНИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК ИЗ РАЙОНОВ ПРИЦЕНТРОМЕРНОГО ГЕТЕРОХРОМАТИНА *Drosophila melanogaster*. © Е. Н. Андреева, Т. Д. Колесникова, О. В. Демакова, С. А. Демаков, М. Мендес-Лаго, Г. В. Похолокова, Е. С. Беляева, Ф. Росси, У. А. Комор, А. В. Дорошников, П. Дмитри, А. Вилласанте, И. Ф. Жимулев. Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, demakova@bionet.nsc.ru.

В норме районы прицентромерного гетерохроматина в политенных хромосомах слюнных желез *Drosophila melanogaster* в значительной степени недопредставлены и объединены в общий бесструктурный хромоцентр. Мы разработали новый подход для цитологических исследований гетерохроматина политенных хромосом. Обнаружено, что одновременное отсутствие двух важных компонентов гетерохроматина — белков SUUR и SU(VAR)3-9 — приводит к уникальному феномену: вследствие сильной декомпактизации и супрессии недорепликации прицентромерных районов политенных хромосом материал, соответствующий участкам митотиче-

ского гетерохроматина, становится политенизированным и приобретает воспроизводимый дисковый рисунок. Так, у двойных мутантов *SuUR Su(var)3-9⁰⁶* между районами 80 и 81 в политенной хромосоме 3 детектируется более 50 дисков, в формировании которых, как мы показали, участвует материал блоков митотического гетерохроматина h49—h 58. В хромосоме X впервые цитологическому анализу стали доступны участки, соответствующие блокам h26—h29, причем дистальный гетерохроматин хромосомы X (часть блока h26—h28) превращается у мутантов в большую пuffed-подобную структуру. Политенные хромосомы двойных мутантов дают уникальную возможность с помощью метода флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) решать такие важные задачи картирования последовательностей ДНК гетерохроматина, как установление линейного порядка генов внутри отдельных отсековенных фрагментов генома и определение правильной ориентации протяженных фрагментов генома относительно друг друга, а также относительно центромеры. Мы показали, что у мутантов *SuUR Su(var)3-9⁰⁶* впервые в политенных хромосомах некоторые сателлитные последовательности ДНК политенизируются и в ряде случаев картируются в районах с четким дисковым рисунком. Это позволило нам, в частности, точно картировать набор впервые изолированных субтипов сателлитной ДНК семейства 1.688 из хромосомы 3, а также локализовать центромеру хромосомы 3 в определенном хромосомном районе. В целом мы прокартировали примерно 20 уникальных последовательностей ДНК гетерохроматина, а также примерно 20 клонов ДНК (включая и ВАС-клоны), содержащих сателлитные последовательности. Мы подтвердили, а в ряде случаев и уточнили локализацию ряда гетерохроматиновых генов хромосомы 2, а также прокартировали 8 новых протяженных последовательностей ДНК из хромосомы 3. Опираясь на имеющиеся данные по локализации этих генов в митотических хромосомах, мы сумели установить корреляцию между политенизированными участками прицентромерного гетерохроматина политенных хромосом двойных мутантов и блоками гетерохроматина митотических хромосом. Изучая организацию гетерохроматина политенных хромосом у мутантов *SuUR Su(var)3-9⁰⁶*, мы показали: 1) у мутантов в гетерохроматине выявляются домены, значительно различающиеся по белковому составу; 2) каждая из используемых двух мутаций способна независимо оказывать влияние на уровень политенизации отдельных гетерохроматиновых доменов. Таким образом, мы полагаем, что политенные хромосомы двойных мутантов *SuUR Su(var)3-9⁰⁶* представляют собой новую и перспективную модельную систему для картирования гетерохроматиновых последовательностей ДНК и изучения детальной организации гетерохроматиновых доменов.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проекты 06-04-49305-а и 06-04-48387-а), по Междисциплинарному интеграционному проекту РАН (грант № 45), по программе РАН «Молекулярная и клеточная биология» (грант № 10.1), по программе «Ведущие научные школы» (грант № 942.2006.4) и в виде гранта президента РФ МК-540.2007.4.

ИММУНОГИСТОЛОГИЯ ОРГАНОВ МЫШЕЙ, РАЗВИВАЮЩИХ ИНДУЦИРОВАННЫЙ АУТОИММУННЫЙ

ПРОЦЕСС В ОТНОШЕНИИ БЕЛКА ЯДРЫШКА ФИБРИЛЛАРИНА. © А. С. Андриющенко,¹ М. С. Красильщикова,¹ Ю. Добруцки,² О. В. Зацепина.¹ ¹ Институт биоорганической химии РАН, Москва, zatsepin@ibch.ru и ² Ягеллонский университет г. Кракова, 30-387, Польша.

Хорошо известно, что белки клеточного ядра и ядрышка часто выступают в качестве аутоантигенов при системных аутоиммунных заболеваниях, которые относятся к одним из наиболее распространенных болезней человека. Молекулярные основы иммуногенности ядрышковых белков, а также этиология аутоиммунных болезней в целом до сих пор остаются неизвестными. Есть основания полагать, что одной из причин, способствующих возникновению аутоантител к белку ядрышка фибрилларину — фактору раннего процессинга пре-рРНК, — может являться регулярное действие на организм тяжелых металлов, распространенность которых постоянно возрастает благодаря антропогенной деятельности человека. В пользу этого заключения свидетельствуют, в частности, многочисленные данные о том, что воздействие хлорида ртути (HgCl₂) на лабораторных животных определенных генетических линий приводит к индукции аутоантител к фибрилларину. Так же как у людей, этот процесс сопровождается Т-зависимой активацией В-лимфоцитов и появлением иммунных комплексов в клубочках (glomeruli) почек. Однако вопросы о механизмах отложения иммунных депозитов в клетках, а также их возможная цитопатичность в литературе практически не изучались. Одним из подходов к решению этих вопросов является изучение топологии иммунных комплексов (депозитов) в клетках разных органов аутоиммунных животных. В настоящей работе мы применили оригинальный протокол для выявления отложений иммунных депозитов у контрольных (т. е. не проявляющих аутоантител к фибрилларину) и аутоиммунных мышей линии SJL/J, вырабатывающих аутоантитела к фибрилларину в ответ на регулярные инъекции субтоксичных (нелетальных) доз HgCl₂. Полученные результаты показали, что иммунные комплексы помимо почечных телец локализуются в проксимальных отделах нефронов, а также в стенках кровеносных сосудов различных органов. Количественная оценка отложений комплексов в различных отделах почек показала, что их размеры на порядок превышают таковые у контрольных животных. Примечательно, что появление иммунных депозитов в мезангиальных клетках почечных телец сопровождается ослаблением окраски ядрышек антителами к фибрилларину, что может свидетельствовать в пользу цитотоксичности внутриклеточных иммунных депозитов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 05-04-08131офи-а и 07-04-12260офи-а).

СОМАТИЧЕСКАЯ ПОЛИПЛОИДИЯ В МОРФОГЕНЕЗАХ МОЛЛЮСКОВ. © А. П. Анисимов, А. А. Анисимова, Н. Е. Зюмченко, И. А. Кирсанова, Е. В. Табакова, Н. П. Токмакова. Кафедра клеточной биологии Дальневосточного государственного университета, Владивосток, alim@bio.dvgu.ru.

Эндорепродукция отдельных групп клеток, ведущая к соматической полиплоидии (эндополиплоидии), в ряде

случаев становится важным фактором постэмбрионального роста животных и растений. Однако механизмы и значение этого феномена остаются неясными. Нами изучены онтогенетические и филогенетические аспекты эндополиплоидии у моллюсков. На модельном объекте *Succinea lauta* (Gastropoda: Pulmonata) показано, что определенные типы клеток желез, соединительной ткани и нейроны в разной степени полиплоидизируются: от 16с—64с до 128с—256с, а в нейронах до 4—16 тыс. с ДНК. Наряду с полиплоидными клетками ткани сохраняют камбиальные (стволовые?) резервы и способность к регенерации. Эндорепродукция клеток происходит в результате смены полного пролиферативного митоза неполным реституционным митозом, а далее классическим эндомитозом. Методами автордиографии и электронной микроскопии эндомитоз показан как реальная фаза клеточного цикла, в которой митотическое веретено отсутствует, ядерная оболочка сохраняет целостность, но проходит нормальный (митотический) хромосомный цикл. Ядрышки во время эндомитоза не исчезают, но распадаются на фрагменты, которые сохраняют связь с хромосомами. Эндомитотические хромосомы проявляют транскрипционную активность (включение ³H-уридина) на уровне 3—4 % от интерфазной активности, и на их поверхности сохраняются эухроматиновые фибриллы и гранулы. С целью дать универсальное толкование эндополиплоидии мы предположили, что одна полиплоидная клетка может быть рассмотрена как эндоклон, а эволюционное преобразование диплоидно-клеточных клонов в полиплоидные эндоклоны представляет собой олигомеризацию по Догелю на клеточно-тканевом уровне. Тогда важнейшие производные свойства олигомерной системы составят общие особенности полиплоидной стратегии роста. Они включают в себя интенсификацию функции, функциональную экономичность (эргономичность), упрощение внутрисистемной и надсистемной регуляций, повышение надежности геномов и ускорение развития. Названные особенности позволяют рассматривать эндополиплоидию как способ онтогенетических регуляций и одновременно как важный эволюционный фактор, закрепляемый путем естественного отбора («онтогенетические корреляции» и «филогенетические координации» по И. И. Шмальгаузену). Таким образом, эндополиплоидия представляет собой адаптивный морфогенетический фактор, хотя ее роль может различаться в зависимости от специализации клеток и особенностей гистогенезов (Анисимов. Цитология, 1999, 41: 32—39; Anisimov. Cell Biol. Int., 2005, 29: 993—1004). Такой взгляд согласуется с известными данными по соматической полиплоидии в гистогенезах различных видов животных и растений, а также с результатами наших исследований по распространению полиплоидных клеток в железах и ганглиях у 29 видов двусторчатых и 82 видов брюхоногих моллюсков. У двусторчатых ганглии ЦНС, эпидермис, субэпидермальные железы и пищеварительный эпителий сформированы обычными диплоидными клетками; тетраплоидные ядра присутствуют лишь у некоторых видов в базофильных клетках пищеварительной железы. Напротив, брюхоногие обнаруживают отчетливую филогенетическую прогрессию полиплоидии в развитии тканей. Она практически отсутствует у археогастропод, появляется факультативно в некоторых группах мезо- и неогастропод и облигатно распространена у поздних эвтиневральных гастропод (заднежаберных и легочных). По-видимому, значение эндополиплоидии

надо рассматривать в двух аспектах. Умеренная (обычно до $4n-8n$) факультативная полиплоидия возникает в малых группах и у отдельных видов как алломорфные адаптации, связанные с некоторой интенсификацией клеточных функций. Облигатная полиплоидия высоких степеней (сотни и тысячи n), характерная для больших групп, может нести все выше обозначенные преимущества олигомерных систем и выступает в качестве закономерных, более или менее ароморфных изменений онтогенеза. Вместе с тем морфогенетическое значение полиплоидии специфично и несопоставимо с гистогенетической стратегией, основанной на диплоидных клетках.

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда US CRDF (грант RUXO-003-MD-06) и Министерства образования и науки РФ (грант РНП.2.1.2641).

МЕЗЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ-ПРЕДШЕСТВЕННИКИ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА КРЫС В УСЛОВИЯХ АНОКСИИ. © *Е. Б. Анохина, Л. Б. Буравкова.* ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, burakova@imbr.ru.

Мультипотентность костномозговых мезенхимных стромальных клеток-предшественников (МСК) обуславливает их участие в процессах тканевой репарации, которые могут протекать на фоне пониженного содержания кислорода. Ранее нами было показано, что гипоксия (5 % O_2) оказывает стимулирующий эффект на культивируемые МСК из костного мозга крыс, что выражалось в снижении степени гетерогенности культур этих клеток, стимуляции их пролиферативной активности, снижении доли поврежденных клеток в культуре, сохранении паттерна экспрессии специфических для МСК маркеров и их дифференцировочного потенциала (Буравкова, Анохина, 2006, 2007). Эти эффекты могут быть связаны с тем, что снижение кислорода в среде до 5 % обуславливает создание для клеток условий, приближенных к таковым *in vivo*, и представляет собой скорее аппроксимацию нормальных физиологических условий, нежели гипоксическое воздействие. Целью данной работы было оценить воздействие аноксии на культивируемые МСК из костного мозга крыс. В работе использовали МСК 1—4-го пассажей, культивируемые в нормоксических (стандартных условиях CO_2 -инкубатора) или аноксических условиях в течение 4 сут при 37 °С. Аноксические условия создавали в герметичной камере (Stem Cell Technologies, Канада), куда подавалась газовая смесь (95 % N_2 и CO_2) до полного вытеснения кислорода, содержание которого регистрировали с помощью датчика. Морфологию и пролиферативную активность МСК оценивали с использованием фазово-контрастного микроскопа (Axiovert 25, Zeiss), цифровой камеры и программного обеспечения для анализа изображения. Жизнеспособность (количество апоптотических и некротических клеток) и иммунофенотип (экспрессию маркеров CD90, CD45, CD54, CD44, CD73 и CD11b) МСК определяли методом проточной цитофлуориметрии (Epics XL, Beckman Coulter). Способность МСК к остеогенной дифференцировке оценивали по экспрессии щелочной фосфатазы в ответ на остеогенные дифференцировочные стимулы (10^{-8} М дексаметазона, 10 мМ глицерол-2-фосфата и 0.2 мМ 2-фосфо-*L*-аскорбиновой кислоты). Способность к адипогенной дифференцировке оценивали по накоплению в клет-

ках липидных капель в ответ на добавление в среду адипогенных стимулов (0.5 мМ изобутилметилксантина, 1 мкМ дексаметазона и 10 мкг/мл инсулина). Было показано, что при культивировании в аноксических условиях в течение 4 сут МСК сохраняли свои морфологические характеристики, способность к пролиферации и экспрессию характерных для прогениторных клеток маркеров. Доля поврежденных клеток в условиях аноксии не изменялась или несколько увеличивалась за счет процессов апоптоза по сравнению с клетками в условиях нормоксии. В условиях аноксии наблюдались ранние этапы дифференцировки МСК в остеогенном и адипогенном направлениях. Таким образом, культивирование МСК из костного мозга крыс в аноксических условиях в течение нескольких суток не приводило к значительным изменениям их основных свойств, что указывает на устойчивость клеток-предшественников к резкому снижению содержания кислорода. Активация процессов апоптоза является закономерной реакцией на нарушение работы дыхательной цепи митохондрий в условиях полного отсутствия кислорода.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта ОБН РАН.

МЕХАНИЗМ ИОННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В КАНАЛЕ NMDA-РЕЦЕПТОРА И ИХ РОЛЬ В РЕГУЛЯЦИИ НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ Mg^{2+} . © *С. М. Антонов.* Институт эволюционной физиологии и биохимии РАН, Санкт-Петербург, antonov@iephb.ru.

Значение рецепторов глутамата (Глу) NMDA-типа для функционирования ЦНС позвоночных многообразно. Их наиболее известной функцией наряду с другими рецепторами Глу является передача возбуждающих сигналов в глутаматергических синапсах. Кроме того, показано их участие в развитии мозга, формировании кратковременной и долговременной памяти, обучении, а также в патогенезе многих психических заболеваний и двигательных расстройств. Широкий функциональный спектр NMDA-рецепторов определяется их высокой проводимостью для Ca^{2+} , кинетикой активации и возможностью модуляции активности большим количеством эндогенных факторов (глицином, спермином и т. д.). Особенно принципиальным для функции NMDA-рецепторов является блок каналов Mg^{2+} , содержащимся в ликворе (около 2 мМ), обеспечивающий потенциалозависимость проходящих через них токов. При исследовании нейротоксического действия глутамата на нейроны коры большого мозга крыс в первичной культуре ткани нами показано, что в отсутствие Mg^{2+} в физиологическом растворе на «молодых» нейронах (7 DIV) нейродегенерация развивается по механизму некроза начиная с 1 мМ Глу и опосредуется активацией NMDA-рецепторов. На «зрелых» нейронах (14 DIV) Глу начинает проявлять нейротоксическое действие в 100 раз меньших концентрациях (10 мкМ), которое опосредуется также активацией NMDA-рецепторов. Такая эффективность Глу на «зрелых» нейронах может объясняться более высоким уровнем экспрессии NMDA-рецепторов по сравнению с «молодыми». Парадоксально, но добавление 2 мМ Mg^{2+} в физиологический раствор приводит к значительному ослаблению нейротоксического эффекта Глу на «молодых» нейронах, но не оказывает протекторного действия

от некроза на «зрелых». Причины такого различия становятся понятными из экспериментов на одиночных каналах и математического моделирования интегральных токов. При регистрации токов одиночных каналов через NMDA-рецепторы Mg^{2+} -блок выявляется в виде новых, непроводящих — блокированных — состояний, при этом кинетику блокады можно проанализировать, измеряя их длительность. Такой анализ показал, что эффективность Mg^{2+} -блока в значительной мере зависит от наружной и внутриклеточной концентраций проходящих ионов. Это определяется существованием двух мест связывания для основных «токонесущих» ионов (Na^+ и K^+) в наружном вестибуле и одного с внутренней стороны канала NMDA-рецептора. Формализация взаимодействия ионов позволяет провести математическое моделирование интегральных токов и исследовать условия, при которых происходит ослабление Mg^{2+} -блока. Было показано, что ослабление эффективности Mg^{2+} может наблюдаться только в случае накопления с последующим повышением концентрации внутриклеточного Na^+ в результате с его непрерывного входа в нейроны через активированные NMDA-каналы. Накопление Na^{2+} должно быть тем больше, чем больше уровень экспрессии NMDA-рецепторов, а следовательно, их плотность расположения в плазматической мембране нейронов. Таким образом, различие в нейропротекторном действии Mg^{2+} на «молодые» и «зрелые» нейроны может объясняться ослаблением Mg^{2+} -блока в результате накопления и значительного повышения концентрации Na^+ в «зрелых» нейронах. В дальнейшем это должно сопровождаться входом воды в нейроны и созданием условий для их гибели по типу некроза.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 02-04-49685 и 05-04-49789).

РОЛЬ SHPs ГЕНА *K-ras* МЫШЦИ В МЕХАНИЗМЕ ФОРМИРОВАНИЯ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К ПУЛЬМОНОКАНЦЕРОГЕНЕЗУ. © *Е. В. Антонцева, Я. Д. Скорытченко, В. И. Каледин, Т. И. Меркулова.* Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, schly@mail.ru.

Ген *K-ras* является одной из наиболее перспективных моделей для изучения механизмов наследственной предрасположенности к развитию опухолей легких, поскольку он идентифицирован как ген, детерминирующий чувствительность к пульмоноканцерогенезу у человека и животных. Мутации в этом гене встречаются примерно в 25—50 % опухолей легких у человека (Johnson et al. *Nature*, 2001, **410**: 1111—1116) и примерно в 60—95 % опухолей легких у мыши (Matzinger et al. *Gene*, 1997, **188**: 261—269), причем локализованы они почти исключительно в трех «горячих» точках — кодонах 12, 13 и 61 (Minamoto et al. *Cancer Detect. Prevent.*, 2000, **24**: 1—12). Известно, что у мыши на их формирование оказывают влияние SHPs в интроне 2 этого гена (Chen et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1994, **91**: 1589—1593). Нами впервые показано, что у линий мышей *Mus musculus*, предрасположенных к развитию рака легких, SHPs в начале интрона 2 гена *K-ras* образуют потенциальный композиционный элемент, состоящий из одного сайта связывания фактора транскрипции GATA-6 и двух сайтов

связывания фактора транскрипции NF- Υ . Установлено, что SHPs, характерные для мышей *M. musculus* устойчивых линий, разрушают сайт GATA-6, а характерные для устойчивых линий мышей *M. spretus* — сайт NF- Υ . Показано, что эти же транскрипционные факторы (NF- Υ и GATA-6) связываются с комплексным сайтом, выявленным в экзоне 1 гена *K-ras* в районе кодона 12, мутации в котором приводят к развитию рака. В пользу функциональной значимости выявленных композиционных элементов свидетельствует тот факт, что при введении животным легочных канцерогенов 3'-метилхолантрена и нитрозоэтилмочевины происходит усиление связывания факторов NF- Υ и GATA-6 с обнаруженными комплексными сайтами только у представителей чувствительных линий. С помощью ПЦР в реальном времени показано, что наблюдаемый эффект не приводит к изменению уровня экспрессии гена *K-ras*. Скорее всего, выявленные композиционные элементы NF-V/GATA-6, располагаясь на достаточно близком друг к другу расстоянии, приводят к локальным изменениям в структуре хроматина, которые и являются причиной высокой избирательности образования аддуктов ДНК-канцероген именно в кодоне 12. Нами показано, что район кодона 12 гена *K-ras* человека также содержит композиционный элемент NF-V/GATA-6. Полученные результаты открывают новые перспективы для изучения молекулярных механизмов возникновения сайтнонаправленных генных мутаций, а также для развития представлений о роли регуляторных белков в инициации и развитии канцерогенного процесса. Полученные данные также имеют значение для выяснения молекулярных основ генетической предрасположенности к пульмоноканцерогенезу.

АНАЛИЗ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ САТЕЛЛИТНЫХ КЛЕТОК ИЗ МЫШЦ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА. © *О. В. Балан* Институт биологии развития РАН, Москва, olga_b81@inbox.ru.

Сателлитные клетки в мышцах взрослого организма формируют стабильный самообновляющийся пул и принимают участие в процессах роста и восстановления мышечной ткани в норме и при повреждении. В определенных условиях сателлитные клетки способны давать несколько линий дифференцировки: миогенную, адипогенную и остеогенную. Задачи исследования — получение и иммуноцитохимическое изучение культуры сателлитных клеток, а также анализ клеточных и молекулярных механизмов дифференцировки сателлитных клеток и миобластов, выделенных из мышц крыс на разных стадиях онтогенеза. Иммуноцитохимический анализ культуры клеток, выделенных из бедренной мышцы 5—7-суточной крысы и взрослого животного, выявил наличие сателлитных клеток (около 80 %) и одноядерных миобластов. Известно, что в сателлитных клетках экспрессируются как стандартные маркеры стволовых клеток (CD34, Msx-1 и C-Met), так и специфические маркеры (Pax7 и MNF). В нашей работе идентификацию сателлитных клеток проводили по экспрессии специфического ядерного маркера Pax7. Белковый продукт гена *Pax7* — транскрипционный фактор, участвующий в процессах самообновления и поддержания пула сателлитных клеток. Миобласты выявляли по экспрессии цитоплазматического белка десмина. Активно пролиферирующие миобласты одновременно с десмином экспрессировали стан-

дартный маркер пролиферации Ki67. Дифференцировка сателлитных клеток по миогенному пути включает в себя активацию сателлитных клеток и их асимметричное деление. В результате последнего одна клетка остается недифференцированной и сохраняет статус стволовой клетки, а другая дает начало миообластам. Образовавшиеся миообласты активно пролиферируют, закончившие деление миообласты сливаются с образованием многоядерных миотуб, синтезируются специфические мышечные белки терминальной стадии дифференцировки, образуются миофибриллы. Поскольку слияние и дифференцировка клеток миогенного ряда регулируются внеклеточным Ca^{2+} , культур сателлитных клеток и миообластов инкубировали в течение 10—14 и 21 ч и 1 сут в среде F-12 с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) с различной концентрацией Ca^{2+} , а также в среде DMEM с добавлением ЭТС с постоянно высокой концентрацией Ca^{2+} . При низких концентрациях внеклеточного Ca^{2+} (до 1.25 мМ) наблюдалось слияние миообластов с образованием двуядерных клеток. Однако экспрессии специфических маркеров миофибрилл (тяжелые и легкие цепи миозина), свидетельствующей о миогенной дифференцировке, не отмечалось. Повышение концентрации внеклеточного Ca^{2+} в среде культивирования приводит к гиперполяризации мембран миообластов как непосредственно, так и через активацию K^+ -каналов. Экспрессия K^+ -каналов и сопровождаемая ими гиперполяризация мембраны инициируют активацию Ca^{2+} -каналов Т-типа. В результате повышается внутриклеточная концентрация Ca^{2+} , приводящая к запуску специфического сигнального пути, опосредованного через образование комплекса кальмодулин—кальцинерин и дефосфорилирование NFAT3 (ядерный фактор, активирующий Т-клетки). Этот сигнальный путь запускает, как известно, процесс дифференцировки. Культивирование клеток в среде с повышенной концентрацией Ca^{2+} (2.0 мМ) приводило к образованию многоядерных миотуб (7—10-е сут культивирования), а впоследствии (10—14-е сут) — к экспрессии тяжелых и легких цепей миозина, характерных для терминальной стадии миогенной дифференцировки. При сравнении дифференцировочных потенциалов можно сделать вывод о том, что выраженная способность к дифференцировке сателлитных клеток и миообластов из мышц новорожденных крыс в значительной мере характерна также и для взрослых животных.

РЕАКЦИЯ БЕЛКА ЯДРЫШКА ФИБРИЛЛАРИНА НА ВОЗДЕЙСТВИЕ $HgCl_2$ IN SITU. © В. В. Барыгина, К. А. Лукьянов, О. В. Зацепина. Институт биоорганической химии РАН, Москва, zatspepin@ibch.ru.

Наблюдения, сделанные за последние годы, позволяют заключить, что ядрышко и его белки во многих случаях относятся к основным мишеням стрессовых воздействий на клетки, приводящих к клеточной гибели путем апоптоза (Rubbi, Milner, 2002; Olson, 2004). К соединениям, которые могут оказывать повреждающее действие на ядрышки и индуцировать гибель клеток, относится $HgCl_2$. Принято считать, что, проникнув внутрь клеток, ионы ртути (II) взаимодействуют с основным фактором процессинга пре-рРНК — белком ядрышка фибрилларин (36—34 кДа, рI 8.5; 321 а. к. у человека), приводя к его деградации. Образующиеся фрагменты фибрилларина выступают в качестве аутоантигенов. Особая «чувст-

вительность» фибрилларина к $HgCl_2$, возможно, связана с наличием в его молекуле двух остатков цистеина, SH-группы которых обладают высоким сродством к ионам ртути. Однако литературные сведения, подтверждающие возможность взаимодействия ртути (II) с фибрилларинном в клетках in situ, в настоящий момент крайне ограничены. Основная цель настоящей работы — изучение подвижности фибрилларина в живых клетках человека HeLa после их инкубации с $HgCl_2$. Клетки HeLa временно трансфицировали плазмидами, кодирующими фибрилларин дикого типа человека, слитый либо с зеленым флуоресцирующим белком GFP (Левицкий и др., 2004), либо с фотоактивируемым белком Dendra (Gurskaaya et al., 2006), а затем подвергали воздействию 40—150 мкМ $HgCl_2$. В контрольных (необработанных) клетках химерный фибрилларин располагался в дискретных ядрышковых зонах, совпадающих с местами локализации эндогенного фибрилларина, выявляемых с помощью специфических антител, а также соответствующих местам синтеза рРНК. Воздействие $HgCl_2$ приводило к резкому подавлению включения предшественника синтеза РНК бромированного уридинтрифосфата и миграции химерного фибрилларина из ядрышка в дискретные фокусы в нуклеоплазме, совпадающие с эндогенным фибрилларинном. Использование конфокальной лазерной микроскопии в сочетании с методом FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) выявило замедление подвижности фибрилларина и истощение его мобильной фракции под воздействием $HgCl_2$. Поскольку мобильная фракция фибрилларина соответствует активной фракции белка (Phair, Misteli, 2000), можно заключить, что эти данные впервые выявили ингибирующее влияние $HgCl_2$ белка фибрилларина — в живых клетках человека.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 05-04-081310фи-а и 06-04-49392).

ВЛИЯНИЕ СООТНОШЕНИЯ ГОМЕОЛОГИЧНЫХ ХРОМОСОМ НА РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ ГЕНОВ *Nanog*, *Oct-4* и *Lmna* В МЕЖВИДОВЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ГИБРИДНЫХ КЛЕТКАХ. © Н. Р. Баттулин,¹ К. В. Юдина,² И. Е. Пристяжнюк,¹ О. Л. Серов.¹
¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, и ² Новосибирский государственный университет, battulin@gmail.com.

Одной из перспективных моделей для изучения репрограммирования генома являются гибриды, полученные от слияния эмбриональных стволовых (ЭС) и дифференцированных клеток. Такие гибриды сохраняют плюрипотентные свойства ЭС-клеток; более того, под влиянием плюрипотентного партнера изменяются профиль активности генов и эпигенетические характеристики соматического генома. Данная работа посвящена изучению репрограммирования генов *Nanog*, *Oct-4* и *Lmna* в 20 межвидовых гибридных клонах серии НМС, полученных от слияния ЭС-клеток *Mus musculus* и спленоцитов *M. caroli*. Транскрипционные факторы *Oct-4* (*Pou5f1*) и *Nanog* являются ключевыми регуляторами плюрипотентных свойств ЭС-клеток и принимают участие в процессах репрограммирования, тогда как экспрессия гена *Lmna* характерна для дифференцированных клеток.

Наше внимание было сфокусировано на изучении экспрессии аллелей указанных генов разного родительского происхождения и статуса метилирования их промоторных районов. Согласно цитогенетическому анализу, хромосомный набор клонов НМС варьировал от околодиплоидного до околотетраплоидного. Различное соотношение гомеологов в клонах НМС позволяет изучать влияние числа хромосом соматического партнера на степень репрограммирования. Было установлено, что во всех 20 клонах гибридных клеток присутствуют транскрипты генов *Oct-4* и *Nanog*, что свидетельствует о сохранении плюрипотентности. Однако в клоне НМС6 уровень экспрессии этих генов значительно снижен по сравнению с остальными клонами. Для дискриминации транскриптов родительских аллелей генов нами были определены первичные структуры фрагментов этих генов в геноме *M. caroli* и выявлены видоспецифичные сайты рестрикции. Используя рестрикционный полиморфизм, мы показали реактивацию соматических аллелей генов *Oct-4* и *Nanog*, ранее неактивных в геноме дифференцированного партнера. Для анализа метилирования были выбраны участки промоторов генов *Nanog*, *Oct-4* и *Lmna*, метилирование которых потенциально влияет на их активность. Для дискриминации аллелей разного родительского происхождения была определена первичная структура этих участков у *M. caroli*. С помощью бисульфитного секвенирования было показано, что данные районы генов *Oct-4* и *Nanog* имеют высокий уровень метилирования в дифференцированных клетках, тогда как в ЭС-клетках они деметилированы. Показано, что в гибридных клонах НМС1 и НМС2 аллели генов *Oct-4* и *Nanog* плюрипотентного партнера остаются неметилированными, тогда как аллели дифференцированного партнера подвергаются деметилированию. Уровень экспрессии гена *Lmna* в гибридных клонах значительно снижен по сравнению со спленоцитами. Анализ метилирования промотора гена *Lmna* показал, что он деметилирован как в ЭС, так и в дифференцированных клетках и остается таковым в гибридных клонах НМС1 и НМС2.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной по интеграционным проектам 14.2 и 52.2 СО РАН.

КОЛОНИИ СОКРАЩАЮЩИХСЯ КАРДИОМИОЦИТОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК СЕРДЦА НОВОРОЖДЕННОЙ КРЫСЫ. © Г. Б. Белостоцкая, Т. А. Голованова, Н. А. Васильева. Институт эволюционной физиологии и биохимии РАН, Санкт-Петербург, k@iephb.ru.

В последние годы сложившееся мнение о неспособности постнатальных сердечных клеток к пролиферации стало подвергаться сомнению. Дополнительно к старым данным о наличии незначительного количества митотических клеток во взрослом сердце (Румянцев, 1982) появились работы, демонстрирующие способность кардиомиоцитов к продвижению по клеточному циклу и активному митотическому делению (Kajstura et al., 2000; Leri et al., 2000; Beltrami et al., 2001). Опубликованы данные о существовании сердечных стволовых клеток во взрослом сердце (Beltrami et al., 2003; Oh et al., 2003; Matsuura et al., 2004). Показано существование сердечных клеток-предшественников (side population cells — SP), экспрессирующих антигены стволовых клеток (Oh et al.,

2004). В серии работ калифорнийских ученых, использовавших экспрессию гена *Is11* в качестве маркера недифференцированных сердечных клеток-предшественников, были представлены данные о наличии таковых в постнатальных сердцах крыс, мышей и человека (Cai et al., 2003; Lauqwitz et al., 2005). На сегодняшний день в мире выявлены и изучены 3 вида сердечных резидентных клеток и клеток-предшественников Islet1⁺-предшественников (Lauqwitz et al., 2005), Lin-c-kit⁺-стволовых клеток (Beltrami et al., 2003) и Sca-1⁺-стволовых клеток (Oh et al., 2003). Все варианты клеток способны к делению с образованием монослоя и разной степени дифференцировки при сокультивировании с неонатальными кардиомиоцитами (Lauqwitz et al., 2005), при действии дексаметазона (Beltrami et al., 2003) или 5-азациитидина (Oh et al., 2003). При этом только Lin-c-kit⁺ способны образовывать колонии, что подтверждает их сходство со стволовыми клетками. В нашей работе показано, что при редком расसेве ($1 \cdot 10^5$ кл./мл) энзиматически выделенных сердечных клеток новорожденной крысы на поверхности чашек Петри к 6—7-м сут культивирования параллельно гипертрофии основной части клеточной популяции наблюдается образование отчетливо выраженных колоний, которые к 10—12-м сут приобретают способность к спонтанным сокращениям (пульсации). Клетки, находящиеся внутри колоний, показали постепенное по мере культивирования созревание рецепторов наружной мембраны и саркоплазматического ретикулума, которое было оценено с помощью Ca²⁺-ответов на действие ряда специфических для сердечной мышцы агонистов — ацетилхолина (20 мкМ), KCl (120 мМ) и кофеина (5—10 мМ). Изучение монослоя культивируемых клеток позволило уже на 3-и сут выявить образование незначительного количества колоний (не более 0.001 % от числа посеянных клеток). На 11-е сут развития были зарегистрированы спонтанно пульсирующие колонии с частотой сокращения 21—25 уд./мин. При этом клетки, находящиеся внутри колоний, значительно мельче окружающих их гипертрофированных кардиомиоцитов. Дальнейшее культивирование показало увеличение частоты сокращений колоний кардиомиоцитов до 35 сокращений в 1 мин на 18-е сут и до 56 — на 26-е сут развития. Нам удалось поддерживать существование пульсирующих колоний в первичной культуре в течение 1 мес, после чего происходила их гибель. При снижении концентрации клеток при посеве в 5—10 раз образование редких микроколоний не сопровождалось дифференцировкой клеток в сокращающиеся кардиомиоциты, что, по-видимому, подтверждает мнение о необходимости контакта клеток-предшественников со взрослыми зрелыми кардиомиоцитами (Pfister et al., 2005). В отличие от резидентных стволовых сердечных клеток (или клеток-предшественников), описанных другими авторами (Beltrami et al., 2003; Oh et al., 2003; Lauqwitz et al., 2005), выявленные нами клетки способны к формированию колоний и спонтанной дифференцировке в обычных условиях культивирования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-49833).

ИНГИБИТОР КАЛЬМОДУЛИНА КАЛЬМИДОЗОЛИУМ ПОДАВЛЯЕТ Na⁺/Ca²⁺-ОБМЕН В МИТОХОНДРИ-

ЯХ. © А. В. Бережнов, В. А. Касымов, В. П. Зинченко. Институт биофизики клетки РАН, Пущино, vprz@mail.ru.

Одной из важнейших функций ионов кальция в митохондриях (МХ) является регуляция активности внутримитохондриальных ферментов. Повышение концентрации Ca^{2+} в митохондриях ($[\text{Ca}^{2+}]_m$) может стимулировать окислительный метаболизм и производство АТФ, каскад образования стероидов, регулировать пирогликолизную активность, а также при определенных условиях индуцировать образование митохондриальной проницаемой поры. При транспорте Ca^{2+} меняются митохондриальный потенциал и продукция активных форм кислорода. Главный механизм выхода Ca^{2+} из митохондрий клеток сердца, мозга, скелетных мышц, бурого жира, хромоаффинных клеток, клеток поджелудочной железы и большинства опухолевых клеток является $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник ($\text{Na}^+/\text{Ca}_m^{2+}$), основной функцией которого является регуляция уровня $[\text{Ca}^{2+}]_m$. Существует ряд ингибиторов обменника, включая тетрафенилфосфоний (TPP^+), CGP37157 и клонозепам. Ингибирование $\text{Na}^+/\text{Ca}_m^{2+}$ приводит к увеличению концентрации Ca^{2+} в МХ, усиливает окислительный метаболизм и уровень NAD(P)H. Механизмы регуляции активности $\text{Na}^+/\text{Ca}_m^{2+}$ во многом неясны. На роль эндогенных ингибиторов $\text{Na}^+/\text{Ca}_m^{2+}$ претендуют активные формы кислорода и свободные ненасыщенные жирные кислоты. В настоящей работе показано, что кальмодулин (КМ) участвует в регуляции активности $\text{Na}^+/\text{Ca}_m^{2+}$. Для исследования механизмов регуляции активности $\text{Na}^+/\text{Ca}_m^{2+}$ мы использовали Ca^{2+} -сигналы, вызванные активацией пуринорецепторов клеток АКЭ и ингибитором КМ кальмидазолием (R24571). Регистрировали R24571- и АТФ-индуцированные изменения уровня $[\text{Ca}^{2+}]_i$, $[\text{Ca}^{2+}]_m$, собственную флуоресценцию NAD(P)H, дыхание и мембранный потенциал МХ. Для измерения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ использовали Indo-1 и Fluo-4. Для измерения $[\text{Ca}^{2+}]_m$ использовали Rhod-2, хлортетрациклин и флуоресценцию NAD(P)H как непрямоу индикатор изменения $[\text{Ca}^{2+}]_m$. Показано, что АТФ вызывает транзитное увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, $[\text{Ca}^{2+}]_m$ и флуоресценции NAD(P)H. Предварительное добавление ингибиторов $\text{Na}^+/\text{Ca}_m^{2+}$ (TPP^+ и CGP37157) мало меняет сигнал в цитозоле, но подавляет выход Ca^{2+} из МХ. Добавление иономицина (0.5 мкМ) на плато Ca^{2+} -сигнала в МХ вызывает уменьшение флуоресценции Rhod-2 и NAD(P)H до исходного уровня, что отражает выход Ca^{2+} из МХ. Увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_m$ сопровождается усилением сопряженного дыхания. Эти результаты показывают, что $[\text{Ca}^{2+}]_m$ контролируется активностью $\text{Na}^+/\text{Ca}_m^{2+}$ -обмена и определяет скорость продукции NAD(P)H и скорость окислительного фосфорилирования. Наблюдаемая корреляция между изменением концентрации Ca^{2+} в МХ, флуоресценции NAD(P)H и скоростью сопряженного дыхания объясняется Ca^{2+} -зависимой активацией NAD-зависимых дегидрогеназ и увеличением потока протонов и электронов через дыхательную цепь в МХ. Добавление ингибитора КМ R 24571 вызывает транзитный Ca^{2+} -сигнал в цитозоле и необратимое увеличение флуоресценции NAD(P)H и Rhod-2 в клетках АКЭ. Мы предположили, что R24571 аналогично CGP37157 ингибирует $\text{Na}^+/\text{Ca}_m^{2+}$. Иономицин, как и в случае с ингибиторами, вызывал возвращение флуоресценции NAD(P)H и Rhod-2 к исходному уровню, что указывало на уменьшение концентрации Ca^{2+} в МХ. Добавление ротенона с олигомицином препятствовало накоплению Ca^{2+} в МХ. Предварительная

обработка клеток R24571 в концентрациях, не повышающих $[\text{Ca}^{2+}]_i$, не меняло Ca^{2+} -сигнала на АТФ в цитозоле, однако тормозило выход Ca^{2+} из МХ, измеренный по флуоресценции NAD(P)H и Rhod-2. Таким образом, R24571 ингибирует $\text{Na}^+/\text{Ca}_m^{2+}$ в МХ клеток АКЭ, что указывает на участие КМ в регуляции его активности.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВОГО СОСТАВА МУЛЬТИМОЛЕКУЛЯРНЫХ СИГНАЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ, ВКЛЮЧАЮЩИХ В СЕБЯ СИГНАЛЬНЫЕ МОЛЕКУЛЫ И ЭЛЕМЕНТЫ ЦИТОСКЕЛЕТА. © Д. Е. Бобков, А. А. Айзенштадт, Г. П. Пинаев. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

К настоящему времени известно, что все биологически активные молекулы при взаимодействии с клеткой вызывают перестройку цитоскелета. Методами иммунофлуоресценции и конфокальной микроскопии нами ранее было показано, что альфа-актинин-4 и p65 совместно локализируются в цитоплазме нестимулированных клеток и совместно перераспределяются в ядро под действием эпидермального фактора роста и цитохалазина D, что говорит об их связи с актиновым цитоскелетом. Иммунопреципитация из тотальных клеточных лизатов показала также, что p65-субъединица NF-кappaB и альфа-актинин-4 обнаруживаются в составе одного комплекса, который остается стабильным независимо от предобработки клеток эпидермальным фактором роста или цитохалазином D, что доказывает существование прямой или опосредованной связи между этими белками. Ранее в нашей лаборатории было показано, что реорганизация цитоскелета при действии на клетки агентов, запускающих сигнальные процессы, происходит достаточно быстро, в течение 5—10 мин после действия лиганда, и мы предполагаем, что мультимолекулярные сигнальные комплексы могут претерпевать в течение этого времени значительные изменения в своем составе. Для выделения подобных нестабильных белковых комплексов был разработан метод предварительной обратимой сшивки белков, позволяющий стабилизировать комплексы во время экстракции. В литературе есть данные, описывающие применение формальдегида для создания таких сшивок между близко находящимися белками, а также между белками и нуклеиновыми кислотами. Наличие таких работ привело нас к предположению о возможности использования формальдегида при выделении примембранных сигнальных комплексов, формирующихся на начальных этапах проведения сигнала. Для проверки влияния формальдегида на перестройки актинового цитоскелета мы провели наблюдение за их динамикой под влиянием микромолярных концентраций формальдегида на начальных этапах его воздействия. Показано, что при воздействии формальдегида в сверхнизких концентрациях (30 мкМ) клетки линии A431 остаются живыми и активно функционируют, о чем говорят активные перестройки актиновых структур, происходящие в течение 0.5 ч после воздействия. Нами был разработан новый метод быстрой экстракции примембранных комплексов без полного разрушения клетки и клеточных структур. Этот метод предусматривает предварительную обработку клеток микромолярными концентрациями формальдегида для стабилизации образующихся белковых комплексов. Результаты экспериментов, проведенных на нормальных и трансформированных фибробластах крысы (клетки ли-

ний REF и E-Ras), показали, что тропомиозин, принимающий участие в перестройках актиновых структур и входящий в состав высокомолекулярных подмембранных комплексов, выходит из клеток при быстрой экстракции. Новый подход может быть использован для выделения и других лабильных мультимолекулярных комплексов. Полученные путем обычной экстракции после предобработки клеток 30 мкМ формальдегидом лизаты были разделены методом гель-фильтрации на колонке superose 6HR, а полученные фракции проанализированы методами электрофореза и иммуноблотинга. Обнаружено, что среди высокомолекулярных (более 400 кДа) фракций можно выделить по крайней мере одну, в составе которой одновременно выявляется несколько цитоскелетных и сигнальных белков: р65-субъединица транскрипционного фактора NF-κарраВ, альфа-актинин-4, MEKK1 и тропомиозин.

Работа выполнена при финансовой поддержке в виде гранта президента РФ по поддержке ведущих научных школ (грант НШ-7852.2006.4).

ПРОИСХОЖДЕНИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ МЕЙОЗА НА ОСНОВЕ ИНТЕГРАЦИИ МЕХАНИЗМОВ КЛЕТОЧНОГО ДЕЛЕНИЯ И РЕКОМБИНАЦИИ ДНК. © Ю. Ф. Богданов. Институт общей генетики РАН, Москва, ubogdanov@vigg.ru.

Результаты собственных исследований и данные литературы позволяют реконструировать процессы, происходившие на клеточном уровне, которые привели к формированию мейоза у одноклеточных эукариот примерно 850 млн лет назад (Богданов. Генетика, 2003, 257: 453—473; Богданов. Онтогенез, 2004, 35: 415—423; Bogdanov et al. Int. Rev. Cytol., 2007, 257: 83—142). Для реконструкции приходится использовать данные, полученные на одноклеточных сумчатых грибах и многоклеточных растениях и животных. Мейоз как часть полового процесса эукариот возник путем интеграции трех внутриклеточных явлений: 1) преобразованного в форму плановой рекомбинации явления репарации молекул ДНК (Marcon, Moens. Bioessays, 2005, 27: 795—808); 2) возникновения de novo белковых хромосомных осей, затем преобразовавшихся в синаптонемные комплексы (Bogdanov et al. In *Silicom Biol.*, 2003, 3: 173—185; Loidl. Chromosoma, 2006, 115: 260—272; Kleckner. Chromosoma, 2006, 115: 175—194); 3) специфического преобразования аппарата митоза (Namant et al. Curr. Biol. 2005, 15: 948—954). Вопрос о моно- или полифилетическом возникновении мейоза остается открытым, однако классическая схема мейоза имеет, по-видимому, монофилетическое происхождение. В ходе эволюции новое содержание внутриклеточных явлений могло сложиться путем мутаций, изменивших структуру ферментов и структурных белков, а также «перетасовки» доменов структурных белков. Однако в ходе возникновения хромосомных осей и синаптонемных комплексов имел место многоступенчатый процесс появления новых белков. Программа репарации случайных повреждений молекул ДНК путем рекомбинации с нормальной ДНК-матрицей (возникающая у эубактерий около 3.5 млрд лет назад) у эукариот преобразовалась в плановую рекомбинацию гомологичных хромосом (и формирования хиазм). Мейотическая рекомбинация запускается в тех условиях, когда необходи-

мо «спасение» генома путем гаплоидизации (споруляции и других вариантов начала полового процесса). В предистории возникновения синаптонемных комплексов, по-видимому, сначала сформировался специфичный для мейоза когезиновый комплекс, скрепляющий профазные сестринские хроматиды, и возникли «линейные элементы» хромосом (например, у *Schizosaccharomyces pombe*), а затем имел место слабоселективный процесс накопления неконсервативных структурных белков, формирующих синаптонемный комплекс в разных царствах эукариот (Bogdanov et al. In *Silicom Biol.*, 2003, 3: 173—185). Исследование когезинов современных организмов позволяет полагать, что ключевой и специфичный для мейоза когезин Rec8 растений, грибов, беспозвоночных и позвоночных животных сформировался путем перетасовки белковых доменов соматического когезина Rad21 и что эти домены консервативны во всех царствах эукариот (Гришаева и др. Молекуляр. биол., 2007, т. 41, № 3). Принципиальная для формирования мейоза (из существовавшего ранее митоза) перестройка аппарата кинетических стадий клеточного деления состояла в том, что гидролиз когезина Rec8 в центромерном районе хромосом во время первого деления мейоза оказался заблокированным с помощью возникших de novo мейоз-специфичных белков семейства шугошинов. Шугошины регулируют гидролиз когезина Rec8 путем его обратимого дефосфорилирования. Блок гидролиза когезинов в центромерном районе стал первым условием, обеспечившим монополярность кинетохоров, и сестринские хроматиды стали отходить к одному полюсу. Монополярность кинетохоров в первом делении мейоза в совокупности с хиазмами обеспечила редуцированный характер этого клеточного деления. Шугошины есть у всех изученных на их присутствие в мейозе эукариот (Bogdanov et al. Int. Rev. Cytol., 2007, 257: 83—142; Namant et al. Curr. Biol., 2005, 15: 948—954).

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 05-04-49052) и по программе президиума РАН «Биоразнообразие и динамика генофондов».

ДИНАМИКА ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ХРОМОСОМ В ООГЕНЕЗЕ НЕКОТОРЫХ НАСЕКОМЫХ. © Д. С. Боголюбов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, dmitr@mail.cytspb.rssi.ru.

В оогенезе многих (однако далеко не всех) животных хромосомы ооцита на определенной стадии оогенеза конденсируются и формируют так называемую кариосферу, или кариосому. Считается, что формирование кариосферы сопровождается снижением транскрипционной активности хромосом, однако во многих работах прежних лет было показано, что иногда кариосфера продолжает включать ³H-уридин, что свидетельствует о неполной инактивации генома ооцита в этот период. Впервые на ооцитах насекомых, имеющих яичники мероистического типа различного строения (политрофного и телотрофного), удалось проследить динамику транскрипционной активности хромосом, собранных в кариосферу, с помощью микроринъекций в ооплазму 5-бromoуридин-5'-трифосфата (бром-УТФ). В качестве объектов исследования были использованы ооциты жука-чернотелки *Tenebrio molitor* (Coleoptera-Polyphaga:

Tenebrionidae) и скорпионницы *Panorpa communis* (Me-coptera: Panorpidae). Показано, что ядро ооцита до формирования в нем кариосферы транскрипционно активно. На начальных этапах ее формирования (превителлогенез) в ней все еще обнаруживаются немногочисленные участки, включающие бром-УТФ. Однако кариосфера, заканчивающая свое развитие (поздний вителлогенез), не включает бром-УТФ, что свидетельствует о практически полном прекращении синтеза РНК в ооцитах исследованных видов насекомых на поздних стадиях оогенеза. Данные выводы подтверждаются с помощью иммуноэлектронной микроскопии с использованием антител к некоторым факторам транскрипции и процессинга мРНК: РНК-полимеразе II, малым ядерным РНП сплайсинга, SR-белку SC35. Обнаружено, что на стадии, предшествующей формированию кариосферы, эти факторы преимущественно ассоциированы с перихроматиновыми фибриллами, являющимися, как известно, морфологическим выражением первичных транскриптов мРНК, однако на поздних этапах развития кариосферы они перераспределяются из перихроматиновых участков ядра в различные экстрахромосомные ядерные тельца.

Работа посвящена памяти одного из старейших сотрудников Института цитологии РАН моего учителя проф. М. Н. Грузовой, посвятившей всю жизнь исследованию кариосферы и экстрахромосомных внутриядерных органелл ооцитов. Исследования с помощью конфокальной микроскопии проведены с использованием оборудования ЦКП «Материаловедение и диагностика в передовых технологиях».

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 06-04-48904) и по программе поддержки ведущих научных школ (грант НШ-1125.2006.4).

ИНВАЗИВНЫЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА *E. coli*, ПРОДУЦЕНТА МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ ГРИМЕЛИЗИНА, ОГРАНИЧЕННО РАСЩЕПЛЯЮЩЕЙ АКТИН. © Е. С. Божюкина,¹ С. Ю. Хайтлина,¹ Т. Адам.² ¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, bozhokina@yahoo.com, и ² Институт микробиологии и гигиены, Берлин, Германия, thomas.adam@charite.de.

Процесс проникновения бактерий в эукариотические клетки основан на взаимодействии бактериальных факторов с сигнальными системами клетки и цитоскелетом. Поэтому исследование инвазии бактерий является моделью для изучения лиганд-рецепторных отношений, роли цитоскелета в передаче сигнала и сборке актиновых структур клетки. Кроме того, чувствительность клеток к инвазии может быть показателем физиологического состояния клетки при различных воздействиях и степени ее трансформированности. Исследуя инвазивную активность бактерий, содержащих актин-специфическую металлопротеиназу ЕСР32, мы выявили корреляцию между появлением протеолитической активности и способностью бактерий проникать в эукариотические клетки (Efremova et al., 2001; Ефремова и др., 2004). Чтобы доказать участие протеазы ЕСР32 в инвазии, необходимо выяснить, появляется ли способность к инвазии при введении гена протеазы в неинвазирующие бактерии.

ЕСР32 является минорным белком бактерий, идентифицированных с помощью рутинных микробиологических тестов как *E. coli* А2 (Khaitlina et al., 1991). Ранее очистка небольшого количества фермента позволила определить его N-концевую последовательность (Martveyev et al., 1996). Однако эта последовательность не была найдена в геноме, что затруднило поиск гена протеазы ЕСР32 и привело к дополнительному исследованию систематического положения штамма А2. Результаты 47 биохимических тестов системы VITEK2 (BioMérieux) и секвенирование гена 16S-мРНК показали, что штамм А2 сходен с бактерией *Serratia grimesii* или эти бактерии идентичны. Для обнаружения гена протеазы в штамме А2 и в референтном штамме *S. grimesii* DSMZ 30063 была использована последовательность гена протеализина недавно охарактеризованной металлопротеазы *S. proteamaculans*, N-концевая последовательность которой сходна с N-концевой последовательностью ЕСР32 (Demidyuk et al., 2006). Белок, кодируемый обнаруженным геном, содержит 50-аминокислотный пропептид, за которым следует фрагмент, гомологичный N-концевой последовательности ЕСР32. И полный, и укороченный (не содержащий пропептидной последовательности) гены из штаммов *S. grimesii* DSMZ 30063 и А2 были клонированы и экспрессированы в *E. coli* К12. Индукция экспрессии этих генов с помощью IPTG увеличивала долю полипептидов с мол. массами 37 и 32 кДа до 50—60 % белка соответствующего лизата. Лизаты бактерий, в которых экспрессировался полный ген, расщепляли актин с образованием фрагмента 36 кДа, N-концевая последовательность которого Val-Met-Val-Gly-Met-Gln соответствует сайту расщепления актина Gly 42-Val 43 протеазой ЕСР32 (Khaitlina et al., 1991). Аналогично расщепляют актин лизаты бактерий штамма *S. grimesii* DSMZ 30063. Протеолиз актина ингибируется ЭДТА и *o*-фенантролином, что в сочетании с присутствием в первичной структуре белка Zn-связывающего мотива позволяет отнести фермент к классу металлопротеиназ. Таким образом, протеиназа, обнаруженная нами в *S. grimesii* и названная гримелизином, сходна с протеазой ЕСР 32 по ряду свойств, включая способность ограниченно расщеплять актин. Для изучения инвазивных свойств бактерий, синтезирующих природный и рекомбинантный гримелизин, клетки эпидермоидной карциномы гортани Нер-2 инкубировали с бактериями референтного штамма *S. grimesii* или рекомбинантного штамма *E. coli* К12 и анализировали с помощью конфокальной микроскопии. При этом в двух сериях независимых экспериментов бактерии обоих штаммов обнаруживались в цитоплазме клеток. Бактерии контрольного штамма *E. coli* К12 с плазмидой, не содержащей гена гримелизина, в клетки Нер-2 не проникали. Для подтверждения данных об инвазивной активности рекомбинантного штамма проводится количественный анализ инвазии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-49604) и ассоциации INTAS (грант 05-109-5363).

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ УЛЬТРАСТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ И ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ ГИБРИДНЫХ КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ СЛИЯНИИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТОК И ФИБРОБЛАСТОВ. © А. А. Болтенгаген, Н. В. Губанова, Е. А. Ку-

илова, Е. В. Киселева, А. Г. Шилов. Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, alxshilov@mail.ru.

Известно, что в результате слияния с эмбриональными стволовыми клетками можно репрограммировать ядра соматических клеток до плюрипотентного состояния. Для анализа механизмов и последствий этого сложного процесса в настоящей работе проводили сравнительное исследование с помощью световой и электронной микроскопии морфологических параметров клеток культуры фибробластов, ЭС-клеток, а также стабильных гибридов, полученных при их слиянии. В работе использовали мышинные ЭС-клетки линии НМ-1, клетки культуры первичных эмбриональных фибробластов мышей линии DD/c и гибридные клетки стабильных клонов HESF 1-1 и HESF4-1. Оценку плюрипотентности этих гибридных клонов проводили посредством гистологического анализа тератом, образованных после подкожной инъекции клеток бестимусным мышам. Исследование полутонких и ультратонких срезов показало, что фибробласты представлены одиночными клетками и содержат все органеллы, типичные для дифференцированных клеток: уплощенное ядро, большое количество митохондрий, развитые ЭПР и АГ, лизосомы. ЭС-клетки растут колониями, представляющими собой обособленные, часто многослойные группы клеток. Процесс формирования колоний можно условно разделить на три стадии: 1) однослойные колонии, включающие в себя слегка вытянутые клетки, содержащие крупное светлое ядро и умеренное количество цитоплазматических органелл; 2) двух-трехслойные колонии, состоящие из уплощенных поверхностных клеток и центральных округлых клеток с большим ядром и компактным хроматином, среди которых часто встречаются клетки на стадии митоза; 3) многослойные колонии, представляющие собой наиболее гетерогенную популяцию клеток, включающую в себя уплощенные поверхностные клетки, и центральные клетки, различающиеся по морфологии и отделенные от поверхностных клеток слоем внеклеточного матрикса. Центральные клетки формируют группы тесно контактирующих между собой клеток, отделенных друг от друга широким межклеточным пространством. Установлено, что морфология колоний гибридов и ЭС-клеток сходны. В тератомах, полученных от исходной линии ЭС-клеток НМ-1, обнаружены производные всех трех зародышевых листков: ороговевающий эпителий и глия, различные типы соединительной ткани, хрящ, кость, мышцы, жировая и лимфоидная ткани, реснитчатый, железистый и кишечный эпителии. Гибридные клетки показали снижение спектра дифференцировки в сторону мезодермального листка. Таким образом, гибридные клетки, полученные в результате слияния эмбриональных стволовых клеток и фибробластов, сходны с родительскими эмбриональными стволовыми клетками по поведению в культуре, морфологии колоний и плюрипотентности.

СТРУКТУРНО НЕ СВЯЗАННЫЙ И СВЯЗАННЫЙ АЛЬФА-АКТИНИН В КЛЕТКАХ А431. © А. Большакова,¹ О. Петухова,¹ Л. Туроверова,¹ Д. Тентлер,¹ К.-Е. Магнуссон,² Г. П. Пинаев.¹ ¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и ² Университет г. Линчепинга, Швеция.

Альфа-актинины относятся к семейству актинсвязывающих белков, способствующих сшиванию F-актина в

пучки и связыванию F-актина с плазматической мембраной. Описаны четыре изоформы альфа-актининов с мол. массой 100 кДа. Альфа-актинины 1 и 4 являются немышечными формами. Особенным свойством актинина 4 является его способность транслоцироваться в ядро, где он может являться кофактором ряда транскрипционных факторов. Полученные ранее данные позволяют предположить, что в клетках А431 могут выявляться различные функции для изоформ альфа-актининов. Особый интерес представляет обнаружение фрагмента альфа-актинина — белка с подвижностью 73 кДа. Для получения более детального представления о локализации и распределении изоформ альфа-актинина под действием ЭФР между субклеточными фракциями было проведено фракционирование с помощью набора реактивов Qproteome Cell Compartment Kit (Qiagen) для получения фракции несвязанных цитоплазматических белков, мембранных белков, связанных с цитоскелетом, а также белков ядерной ламины. Для анализа перераспределения альфа-актининов в ядре было предпринято фракционирование изолированных ядер. Для оценки влияния внеклеточного матрикса на распределение этих белков анализировали клетки А431, культивируемые обычным образом на пластике, клетки в суспензионном состоянии и после распластывания их на фибронектине. Показано, что белки с подвижностью 100 кДа, узнаваемые поликлональными антителами, полученными к N-концевому пептиду актинина 4, обнаруживались во всех фракциях после фракционирования с помощью вышеуказанного набора реактивов и ядерного фракционирования. Доля фрагментов с подвижностью 72 кДа была увеличена во фракциях несвязанных цитоплазматических и мембранных белков. В ядерной фракции также обнаруживались белки с подвижностью 150 кДа и более низкомолекулярные белки с подвижностью 40—60 кДа, взаимодействующие с этими антителами. С помощью моноклональных антител к актинину 1 (антитела clone BM-75.2, Sigma) обнаруживался белок с подвижностью 100 кДа во всех фракциях после фракционирования с помощью Qproteome Cell Compartment Kit. Особый интерес представляет обнаружение полноразмерного актинина 1 во фракции ядерной ламины. Вместе с тем эти антитела не обнаруживали фрагмента с подвижностью 72 кДа ни в ядерной, ни в цитоскелетной фракциях. Адгезия к фибронектину сопровождалась увеличением доли полноразмерного белка 100 кДа — актининов 1 и 4 — в цитоскелетной фракции. К такому же результату приводило воздействие ЭФР. Кроме того, воздействие ЭФР изменяло соотношение актининов 1 и 4 между фракциями изолированных ядер. Распластывание клеток на фибронектине приводило к увеличению доли белка 72 кДа в мембранной фракции. Таким образом, влияние внеклеточного матрикса затрагивает мембранную, ядерную и цитоскелетную фракции и не изменяет фракцию несвязанных цитоплазматических белков. Полученные результаты показали, что влияние внеклеточного матрикса приводило к более значительным изменениям в распределении актининов в мембранной, цитоскелетной и ядерной фракциях по сравнению с воздействием ЭФР, а распределение между фракциями белка 72 кДа происходило различным образом для актининов 1 и 4 при данных воздействиях, возможно ввиду различных функций этих двух изоформ альфа-актинина.

Работа выполнена при финансовой поддержке в виде гранта президента РФ по поддержке ведущих научных

школ, 2006—2007 (НШ-7852.2006.4) и гранта по программе Visby Шведского института.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КАРИОТИПОВ ДВУХХРОМОСОМНЫХ ЗЛАКОВ. © Н. Л. Большева,¹ Т. Е. Саматадзе,¹ О. В. Муравенко,¹ И. В. Носова,¹ А. В. Родионов,² А. В. Зеленин.¹ ¹ Институт молекулярной биологии РАН, Москва, chrom@eimb.ru и ² Ботанический институт РАН, Санкт-Петербург, Alexander_Rodionov@pobox.spbu.ru.

Систематика злаков с двуххромосомными геномами не вполне ясна. Так, представителей рода *Zingieria* традиционно относят к трибе AVENEAE, а рода *Calpodium* — к трибе POEAE. Однако ряд систематиков считают, что *Zingieria* и *Calpodium* филогенетически близки и формируют отдельную трибу. Предполагают также, что полиплоидные представители *Zingieria* и *Calpodium* с $2n = 8$ и 12 могли возникнуть в результате межвидовой гибридизации *Zingieria bibersteiniana* и *Calpodium spp.* Карิโอотипы *Z. bibersteiniana* (Claus) P. Smirn. ($2n = 4$), *Z. trichopoda* ($2n = 8$) и *Calpodium versicolor* (Stev.) Schmalh ($2n = 4$) были изучены с помощью методов высокоразрешающего дифференциального С- и DAPI-окрашивания и FISH с ДНК-зондами 5S- и 45S-рибосомных генов. Установлено, что при С-окрашивании у *Z. bibersteiniana* выявляются крупные прицентромерные и мелкие интеркалярные блоки гетерохроматина, в то время как у *C. versicolor* прицентромерные блоки значительно меньше, а интеркалярные С-блоки несколько крупнее. Несмотря на некоторые различия в размерах, расположение интеркалярных блоков в хромосомах *Z. bibersteiniana* и *C. versicolor* совпадает. Сравнение хромосом *Z. trichopoda* с хромосомами *Z. bibersteiniana* и *C. versicolor* показало, что рисунки С-окрашивания хромосом 1 и 2 *Z. trichopoda* и *Z. bibersteiniana* имеют значительное сходство. Однако в хромосомах *Z. trichopoda* нет крупных прицентромерных С-блоков, как у *Z. bibersteiniana*. Эти результаты хорошо согласуются с результатами FISH (Kotseruba et al., 2003) — выявлено сходство двух пар хромосом *Z. trichopoda* с хромосомами *Z. bibersteiniana*. Рисунок С-окраски хромосом 3 и 4 *Z. trichopoda* сходен с таковым у *C. versicolor*. Однако размеры нескольких интеркалярных С-блоков значительно больше у *Z. trichopoda* в сравнении с *C. versicolor*. FISH выявил сайт 45S-генов в прицентромерном районе хромосом 1 и 5S-генов в коротком плече хромосомы *Z. bibersteiniana*. У *Z. trichopoda* 45S-гены локализованы в длинном плече хромосомы 3, а 5S-гены — в коротких плечах хромосом 2 и 4, что соответствует литературным данным. Кроме того, у обоих видов цингерий часто встречаются множественные минорные сайты, распределенные по всей длине хромосомных плеч. У исследованного нами образца *C. versicolor* из Тебердинского заповедника 45S- и 5S-гены колокализованы в длинном плече хромосомы 1 и в минорном сайте хромосомы 2. Такое расположение сайтов рибосомных генов отличается от описанного ранее в карิโอотипе образца этого вида с Восточного Кавказа (Kotseruba et al., 2005). Таким образом, результаты FISH-анализа указывают на наличие дивергенции *C. versicolor* в изолированных популяциях. Проведенное исследование подтверждает предположение об общности происхождения двуххромосомных злаков *Z. bibersteiniana* и *C. versicolor* и о происхождении *Z. trichopoda* в результате отдален-

ной гибридизации предковых видов *Z. bibersteiniana* и *C. versicolor*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 05-08-33607 и 07-04-00268).

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ FOXA, ВОВЛЕЧЕННЫХ В МЕХАНИЗМ ИХ ОПУХОЛЕСУПРЕССОРНОГО ДЕЙСТВИЯ. © Л. О. Брызгалов, Н. И. Ершов, Д. Ю. Ощепков, В. И. Каледин, Т. И. Меркулова. Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск.

Ранее на экспериментальных моделях химического гепатоканцерогенеза нами было показано, что транскрипционные факторы FOXA (по старой номенклатуре — HNF3), играющие ключевую роль в дифференцировке клеток печени (Schrem et al., 2002), являются весьма вероятными кандидатами на роль тканеспецифических опухолевых супрессоров (Merkulova et al., 2005). В данной работе с целью выяснения механизма опухолесупрессорного действия FOXA предпринят поиск генов-мишеней этих факторов, продукты которых могут участвовать в регуляции процессов пролиферации и (или) апоптоза. Поскольку известно, что в печени взрослых мышей наблюдается высокий уровень экспрессии белков семейства FOXA, а в тканях почки их экспрессия отсутствует, из базы данных Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) нами было отобрано 686 генов, уровень экспрессии которых в печени отличался более чем в 2 раза от такового в почках. Можно ожидать, что эта выборка обогащена генами-мишенями FOXA. Затем из них было выбрано 40 генов, продукты которых, согласно данным литературы, могут иметь отношение к апоптозу и клеточному циклу. С помощью метода SITECON (Oscherkov et al., 2004) в последовательностях промоторных районов этих генов (от -5000 до +1000 п. н. относительно старта транскрипции) был проведен поиск потенциальных сайтов связывания FOXA. Так как регуляторные районы известных генов-мишеней FOXA, как правило, содержат по несколько близкородственных FOXA-сайтов, в качестве потенциальных генов-мишеней этих транскрипционных факторов нами рассматривались только гены, в последовательностях которых находились кластеры из 2 и более FOXA-сайтов (не менее 2 сайтов на 50 п. н.). Таких генов оказалось 15. 9 предсказанных сайтов из этих генов были проверены методом задержки в геле. В экспериментах использовали двухцепочечные олигонуклеотиды, соответствующие предсказанным сайтам, и GST-слитые белки, содержащие ДНК-связывающие домены FOXA3 мыши и FOXA2 крысы. 7 сайтов из 9 взаимодействовали с рекомбинантными белками, при этом связывание 3 из них было сравнимо со связыванием известного FOXA-сайта из промотора гена транстиретина мыши. Самым сильным сайтом связывания для FOXA оказалась последовательность, содержащая четырехкратный повтор тетраплексида GTTT. Подобные повторы были обнаружены в 13 генах, причем в 11 генах они входили в кластеры потенциальных сайтов связывания FOXA. Для изучения влияния FOXA на экспрессию найденных потенциальных генов-мишеней была использована модель экспериментальных животных, в печени которых снижается актив-

ность этого транскрипционного фактора в результате обработки гепатоканцерогенами. Мы показали, что введение ортоазоаминотолуола (ОАТ) 12-суточным мышам линии ICR приводит к значительному снижению ДНК-связывающей активности FOXA и в дальнейшем к развитию опухолей печени. Поэтому с помощью ПЦР в реальном времени нами было изучено влияние введения ОАТ 12-суточным мышам ICR на экспрессию 6 генов, содержащих кластеры сайтов FOXA: *Creb3l3* (cAMP responsive element binding protein 3-like 3), *Ppp2r5d* (protein phosphatase 2, regulatory subunit B — B56, delta isoform), *Cdc73* (V cell division cycle 73), *Paf1/RNA* ((polymerase II complex component, homolog (*S. cerevisiae*)), *Cul2* (Cullin2), *Ptk2b* (protein tyrosine kinase 2 beta). Наиболее сильно на введение ОАТ реагировали гены *Cul2* и *Cdc73*. Экспрессия гена *Cul2* увеличилась в 10 раз, *Cdc73* — в 5 раз. Экспрессия остальных генов изменялась значительно слабее. Продукт гена *Cul2* гуллин 2 является одним из компонентов E3 убиквитин-протеин-лигазного комплекса. Он способен, подавляя ингибитор SKI-1, активировать CDK, позволяя клетке переходить из G₁-фазы в S-фазу, тем самым способствовать пролиферации (Feng et al., 1999). Таким образом, подавление его экспрессии FOXA белками может приводить к опухолесупрессорному эффекту и, наоборот, его активация при подавлении активности FOXA белков может способствовать образованию опухолей печени.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-00441).

НЕАДГЕЗИВНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ СУБПОПУЛЯЦИИ ПОЛИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ КРОВЕТВОРНЫХ ОРГАНОВ КРЫС И МЫШЕЙ. © Э. И. Буеверова, Е. В. Брагина. Институт биологии развития РАН, Москва, rayushina@mail.ru.

Иерархические отношения внутри популяции полипотентных мезенхимных стромальных клеток (МСК) в настоящее время стали предметом экспериментального анализа. Определены три основных критерия МСК (Domínic et al., 2006): адгезия к пластику в стандартных культуральных условиях, экспрессия специфических поверхностных антигенов (фенотип), способность МСК к дифференцировке *in vitro* в остеобласты, адипоциты и хондробласты. В настоящей работе исследовали особенности адгезии МСК из костного мозга половозрелых крыс и мышей, а также из печени 17-суточных плодов крыс к поверхности культурального пластика. МСК были выделены методом, позволяющим выращивать в виде дискретных колоний фибралопоподобные клетки, изучать свойства и учитывать количество колониеобразующих стромальных фибробластов (КОЕ-Ф), содержащихся в гемопоэтических органах (Фриденштейн, 1973, 1980). Адгезия к пластику и другим поверхностям — свойство родоначальных стромальных предшественников, необходимое для изоляции и размножения клеток. Многие авторы приводят различное время, необходимое для адгезии МСК к поверхности культурального сосуда (90 мин, 1—2 ч, 1 или 4—7 сут и т. д.), после чего неприкрепившиеся клетки удаляют во время смены среды, а среди прикрепившихся образуют к 10—14-м сут *in vitro* клоны-колонии. Ниже представлены результаты исследова-

ния колониеобразования МСК из костного мозга половозрелых крыс и мышей в зависимости от времени адгезии к поверхности пластикового матраса. Через 2 и 4 ч, 1, 2, 4 и 7 сут после эксплантации суспензии костномозговых клеток наряду с неприкрепившимися клетками целиком переносили в новые пронумерованные пластиковые матрасы, а матрасы с прикрепившимися клетками заливали свежеприготовленной полной ростовой средой. На 8-сут культивирования адгезивных и неадгезивных клеточных популяций во всех сроках наблюдений проводили смену среды, фиксировали культуры на 11—12-е сут роста. Сравнение численности адгезивных популяций свидетельствует о максимальном увеличении КОЕ-Ф из костного мозга как крысы, так и мыши на 7-е сут *in vitro*. Численность КОЕ-Ф из неадгезивных популяций костного мозга крысы также увеличивается к 8-м сут *in vitro*, но КОЕ-Ф из костного мозга мыши, наоборот, снижается от 2 ч к 8-м сут до единичных колоний. В другой группе опытов клеточные суспензии костного мозга половозрелых крыс и эмбриональной печени 17-суточных плодов крыс выращивали в первичной культуре 7 сут, после чего не прикрепившиеся к пластику клетки со средой были перенесены в новые пронумерованные пластиковые матрасы, а выросшие на 8-е сут колонии стромальных клеток костного мозга и эмбриональной печени фиксировали. В дальнейшем каждые 7 сут роста неадгезивные клетки костного мозга и эмбриональной печени по аналогии с предыдущей схемой переносили в новые пластиковые матрасы. Полное истощение стромальных предшественников пластиком из костного мозга произошло за 49 сут *in vitro* (7 неадгезивных клеточных субпопуляций). Суммарное число колоний, образованных КОЕ-Ф костного мозга из неадгезивных клеточных субпопуляций, увеличилось приблизительно в 6.7 раза по сравнению с числом КОЕ-Ф, полученных из первичной культуры, а суммарное число КОЕ-Ф из эмбриональной печени увеличилось приблизительно в 8.3 раза, что свидетельствует о том, что неадгезивная популяция клоногенных клеток из кроветворных органов является ресурсом МСК *in vitro*. Все колонии из неадгезивных субпопуляций костного мозга были гетерогенны по размеру, в то время как колонии из эмбриональной печени отличались большей гомогенностью, а также меньшим размером и плотной упаковкой клеток в составе колоний. Результаты этих экспериментов служат основой для анализа пролиферативного и дифференцировочного потенциалов неадгезивных субпопуляций из кроветворных органов.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 06-04-48209) и по программе президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АДГЕЗИВНОСТИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА И ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ К КУЛЬТУРАЛЬНОМУ ПЛАСТИКУ И ФИБРОНЕКТИНУ. © Э. И. Буеверова, О. Н. Хныкова, О. В. Паюшина, Е. В. Брагина, Е. И. Домарацкая, В. И. Старостин. Институт биологии развития РАН, Москва, rayushina@mail.ru.

В последние годы мезенхимные стволовые клетки (МСК) привлекают пристальное внимание ученых в пер-

вую очередь в связи с перспективами их применения в регенеративной медицине. Как известно, МСК адгезивны к пластику и другим поверхностям (в том числе к белкам внеклеточного матрикса). Разные клетки гетерогенной популяции МСК могут иметь неодинаковую способность к адгезии; в частности, имеются данные о сниженной адгезивности наиболее ранних стромальных предшественников. Целью настоящей работы было изучение и сравнение адгезивных свойств МСК, определяемых по количеству колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕ-Ф) костного мозга половозрелой крысы и эмбриональной печени 16-суточных зародышей крысы. Для этого суспензию клеток печени эмбрионов или костного мозга половозрелых крыс помещали в пластиковые культуральные матрасы, покрытые или не покрытые фибронектином. Спустя 1 или 7 сут проводили смену среды, после чего в новые матрасы (с фибронектиновым покрытием или без него) и также культивировали до образования колоний. При культивировании на пластике большая часть КОЕ-Ф костного мозга в 1-е сут оставалась в суспензии, не теряя при этом клоногенной способности. После переноса в новый матрас клетки образовывали 8.14 ± 0.97 колоний на 1 млн посаженных клеток, тогда как клетки, прикрепившиеся за 1 сут, — лишь 1.92 ± 0.26 . Большинство же КОЕ-Ф из эмбриональной печени за этот срок прикреплялись к субстрату (прикрепившиеся клетки давали 14.58 ± 0.52 колоний на 1 млн клеток, не прикрепившиеся — 3.18 ± 0.41). Покрытие поверхности фибронектином повышало адгезивность клеток из обоих органов. После инкубации на нем в течение 1 сут в суспензии оставались единичные КОЕ-Ф (для костного мозга 0.40 ± 0.17 колоний на 1 млн клеток, для печени — 0.22 ± 0.04), а эффективность клонирования прикрепившихся клеток превышала таковую на пластике (костный мозг — 6.38 ± 0.41 колоний на 1 млн клеток, печень — 9.38 ± 0.67). Сходная картина наблюдалась и при продлении инкубации до 7 сут: на пластиковом покрытии большинство КОЕ-Ф костного мозга оставались в суспензии (прикрепившиеся клетки давали 02.42 ± 0.37 колоний на 1 млн клеток, а не прикрепившиеся — до 7.42 ± 0.86), тогда как среди клеток печени прикрепившихся КОЕ-Ф было больше, чем не прикрепившихся (соответственно 20.34 ± 1.01 и 13.92 ± 2.00 колоний на 1 млн клеток). К фибронектину за 7 сут прикреплялась большая часть клеток из обоих источников (костный мозг — 9.78 ± 0.39 колоний на 1 млн клеток в прикрепившейся субпопуляции и 2.05 ± 0.39 колонии в не прикрепившейся; печень — 22.46 ± 0.82 и 0.18 ± 0.11 колоний соответственно). КОЕ-Ф, культивируемые на фибронектине, образовывали преимущественно мелкие колонии, тогда как на пластике преобладали более крупные. КОЕ-Ф, полученные из эмбриональной печени, обладали большей адгезивностью по сравнению с полученными из костного мозга (возможно, ввиду особой важности адгезивных взаимодействий в эмбриональном развитии), а образуемые ими колонии были более гетерогенны по морфологии и размерам. Большая адгезивность КОЕ-Ф к фибронектину по сравнению с пластиком может быть объяснена наличием у клеток специфических рецепторов к этому матриксному белку. Дальнейшее изучение адгезивных свойств МСК позволит сортировать их для получения более гомогенной популяции, создать оптимальные подложки для их культивирования и трансплантации, выявить влияние матриксных белков на пролиферацию и дифференцировку этих клеток и т. д.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 06-04-48209) и по программе фундаментальных исследований президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

ДИНЕИН, ДИНАКТИН И ПРОТЕИНКИНАЗА LOSK КАК ОРГАНИЗАТОРЫ РАДИАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ КЛЕТОЧНЫХ МИКРОТРУБОЧЕК. © А. В. Бураков,¹ О. Н. Жанпарова,² О. В. Коваленко,¹ В. И. Родионов,³ Е. С. Надеждина.^{1,4} ¹ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии Московского государственного университета, ² Биологический факультет Московского государственного университета, ³ Медицинский центр Университета Коннектикута, США, и ⁴ Институт белка РАН, Москва, enadezhkina@genebee.mau.ru.

Микротрубочки интерфазной клетки организованы в виде звезды с находящейся в центре centrosомой. Centrosома осуществляет нуклеацию, высвобождение и закоривание микротрубочек, причем к ней обращен минус-конец микротрубочек. Известно, что экспрессия в интерфазных клетках различных рекомбинантных белков, вызывающих ингибирование взаимодействия цитоплазматического динеина, минус-концевого микротрубочкового моторного белка, с его кофактором динактином, например экспрессия фрагмента СС1 главной субъединицы динактина p150glued, приводит к утрате радиальности микротрубочек. Это наводит на мысль о том, что динеин может быть вовлечен в работу centrosомы, в частности в нуклеацию микротрубочек или в их закоривание, либо он участвует в поддержании структурной целостности самой centrosомы, доставляя в нее различные белки. Для проверки этих предположений мы сравнивали влияние микроинъекций антидинеиновых реагентов (фрагмента СС1, моноклональных антител 74.1, рекомбинантного динамитина) на распределение микротрубочек и белковый состав centrosомы в культивируемых фибробластах. Оказалось, что хотя количество основных centrosомных белков, вовлеченных в процессы затравки и удержания микротрубочек, заметным образом в микроинъектированных клетках не изменялось, антидинеиновые реагенты и в самом деле вызывали быструю (за 30–40 мин) утрату радиальности системы микротрубочек. При этом темпы затравки микротрубочек на centrosоме, оцениваемые путем подсчета «комет» белка EB1, оставались неизменными. Таким образом, наиболее вероятным становится предположение о том, что динеин необходим для стабилизации микротрубочек на centrosоме. Для того чтобы более подробно изучить механизм динеинзависимой стабилизации микротрубочек на centrosоме, мы изучали влияние антидинеиновых реагентов на клетки, предварительно обработанные таксолем — веществом, стабилизирующим микротрубочки. В таких клетках радиальная система микротрубочек разрушается. Оказалось, что антидинеиновые реагенты предохраняют радиальную систему микротрубочек от разрушения таксолем. Нами высказано предположение о том, что centrosомный динеин стабилизирует минус-концы микротрубочек на centrosоме, возможно, за счет ингибирования «разрезающих» микротрубочки белков, например катанина. Радиальность системы микротрубочек регулируется на клеточном

уровне, вероятно, путем фосфорилирования специфических белков. Ранее мы описали, что при экспрессии в клетках доминантно-негативного конструкта, ингибирующего активность протеинкиназы LOSK/SLK, в них нарушается радиальная система микротрубочек, причем также за счет ингибирования связывания микротрубочек на центросоме. Мы нашли, что подавление синтеза в клетках LOSK/SLK методом РНК-интерференции также приводит к нарушению радиальной системы микротрубочек. В клетках с ингибированной активностью LOSK/SLK происходит нарушение поляризации аппарата Гольджи на краю раны монослоя, хотя сам аппарат Гольджи сохраняет интактность. Это является косвенным доказательством того, что LOSK/SLK принимает участие в регуляции транспортных процессов в клетке. Белок динактина p150glued был идентифицирован как субстрат протеинкиназы LOSK/SLK и найден сайт фосфорилирования в участке белка между N-концевым доменом, связывающим микротрубочки, и доменом СС1. В своей дальнейшей работе мы собираемся установить значение фосфорилирования этого сайта в организации радиальной системы микротрубочек интерфазных клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 05-04-49015), по программе президента РАН «Молекулярная и клеточная биология» и в виде гранта Фонда Фогарта.

ОНКОСУПРЕССОР И РЕГУЛЯТОР КЛЕТОЧНЫХ КОНТАКТОВ *lethal (2) giant larvae (lgl)* У ДРОЗОФИЛЫ И ЕГО ГАПЛОАДАПТИВНОСТЬ. © Н. Я. Ваисман, М. Д. Голубовский. Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, и Калифорнийский университет, Беркли, США.

Первые доказательства того, что инактивация гена *lgl* у дрозофилы вызывает неопластическую трансформацию *in vivo*, получили Гатеф и Шнейдерман (1969). Утрата функции *lgl* приводила к неограниченному росту имагинальных дисков и нейробластоме мозга. Открытие положило начало новому направлению в исследованиях генетических основ рака. Эволюционно консервативный ген *lgl*, ортолог которого *Hugl-1* найден в геноме человека, стал прекрасной моногенной моделью для анализа тканевых и клеточно-молекулярных аспектов канцерогенеза. Среди признаков злокачественного перерождения эпителиальной ткани у дрозофилы и млекопитающих — утрата клеточной полярности, нарушение клеточной адгезии и изменение тканевой организации. Супрессоры опухоли — это гены нормального развития, контролируемые дифференцировку. Моногенная мутация, приводящая к опухоли, нарушает установление и поддержание дифференцировки клеток. Ген *lgl* с плейотропным действием относится к новому типу онкосупрессоров. Его белковый продукт найден в цитоскелете, мембране и цитоплазме клеток. В процессе нормального эмбриогенеза у белка две разные функции: структурная — установление и поддержание полярности эпителиальных клеток и нейробластов; динамическая — участие во внутриклеточном транспорте и упорядоченном распределении белков, в сигнальных путях, контролирующей деятельность цитоскелета, клеточный цикл и специализацию клеток. Субклеточная локализация белка Lgl на внутренней

мембране наряду с продуктами других супрессоров опухоли у дрозофилы — генов *dlg* и *scribe* — связана с местами межклеточных контактов, преимущественно с районом складчатого адгезионного комплекса (septate junction). Участие в контроле полярности и системы межклеточных контактов в разных типах эпителиальных тканей является первичной функцией опухолевого супрессора *lgl*. Например, нормальная функция *lgl* необходима для асимметричного распределения белка-морфогена во время делений нейробластов и деятельности сигнального пути Notch, определяющего пути специализации клеток. Утрата у мутантов активности *lgl* приводит к неправильному распределению между апикальным и базолатеральным компартментами мембраны молекулярных белковых маркеров и изменению полярности, морфологии клеток, межклеточных контактов и тканевой архитектуры эпителиальных клеток. Мутации *lgl*, нарушая асимметричность распределения продуктов генов клеточной судьбы и архитектуру клеточных контактов, контролируют деление самообновления стволовых клеток. Нами показано, что утрата одной дозы гена *lgl* имеет онтогенетические последствия. Особи *lgl/+* оказались более жизнестойкими, чем обычные особи. В условиях конкуренции за ресурсы развития и содержания имаго при повышенной и пониженной температурах (29 и 16 °C) животные *lgl/+* характеризовались большей выживаемостью и продолжительностью жизни. Воздействие тепловым стрессом на стадии проэмбрио — прогревание зародышевых клеток матерей *lgl/+* — также увеличивает адаптивность потомства *lgl/+* на последующих этапах жизни. Гаплоадаптивность опухолевого супрессора *lgl*, выражающаяся в том, что у гетерозигот *lgl/+* значения признаков выше, чем у нормальных животных, вероятно, отражает одно из свойств сигнальных путей — чувствительность к концентрации их функциональных элементов. Гаплосостояние *lgl* создает условия для оптимального действия генных сетей, связанных с продолжительностью жизни и устойчивостью к стрессу. Одна доза гена определяет благоприятную для приспособленности при стрессе мембранную архитектуру белков и клеточных контактов. Детерминация уровня выживаемости происходит уже в ходе самого раннего оогенеза матерей *lgl/+*. Критический период для активности гена *lgl* в проэмбрио, вероятно, соответствует времени детерминации стволовых клеток зародышевого пути. Недостаток активности *lgl* вызывает нарушение в оогенезе полярности фолликулярных клеток, ответственных за паттернизацию ооцита. Возможно, вклад белка Lgl в формирование свойств соматических и зародышевых стволовых клеток предопределяет качество структурных элементов яйцевой камеры, яйцеклетки и приспособленности будущего потомства.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-00166).

ГЛЮКОЗАМИНИЛМУРАМОИЛДИПЕПТИД ВЛИЯЕТ НА СТРУКТУРУ ХРОМАТИНА. © Т. И. Валякина, М. А. Симонова, Т. Н. Головина, Е. Э. Петрова, В. А. Каддыков, В. А. Несмеянов. Институт биоорганической химии РАН, Москва.

Глюкозаминилмурамоилдипептид (ГМДП) — фрагмент бактериальной клеточной стенки, обладающий им-

муномодулирующей активностью. В ходе поиска молекулярных мишеней ГМДП у клеток миело-моноцитарного ряда ранее нами было показано, что он способен специфически связываться с гистонами H1 и H3. Целью настоящего исследования было выяснить, может ли взаимодействие ГМДП с гистоном H1 влиять на связывание последнего с ДНК и иметь функциональную значимость. Было показано, что ГМДП конкурирует с ДНК фага λ за связывание с гистоном H5 цыпленка — аналогом гистона H1 млекопитающих. Изменения, вызываемые ГМДП в структуре хроматина при связывании с гистоном H5, повышали чувствительность хроматина цыпленка к расщеплению микрококковой эндонуклеазой. Таким образом, взаимодействие ГМДП с гистонами приводит к ослаблению связи последних с ДНК, в результате чего регуляторные участки ДНК могут становиться доступными для факторов транскрипции и ферментов. Нами показано, что мишенью действия ГМДП являются не только клетки миело-моноцитарного ряда, но и клетки фибросаркомы L-929 ГМДП усиливает ФНО-зависимый лизис этих клеток. Проведено электронно-микроскопическое сравнение хроматина интактных клеток линии L-929, а также клеток и изолированных ядер, обработанных ГМДП. Ядра выделяли после инкубации клеток с лизирующим буфером, содержащим Тритон X-100. Их целостность оценивали в световом микроскопе. Были визуализированы хроматиновые нити различных длин и размеров — нуклеосомного и наднуклеосомного строения. При этом нуклеосомы на хроматиновых нитях как в препаратах ядер, обработанных ГМДП, так и в препаратах ядер, выделенных из обработанных ГМДП клеток, утрачивали вид «классических» нуклеосом и имели неправильные формы и размеры. Упорядоченность в расположении нуклеосом вдоль хроматиновых нитей также нарушалась. Отмечены увеличения межнуклеосомных расстояний, появлялось значительное количество одиночных нуклеосом. Часть хроматиновых волокон при распластывании ядер приобретала вид гладких петлевых структур, лишенных нуклеосомного строения. В хроматине контрольных образцов ядер петлевые структуры встречались гораздо реже. Полученные данные свидетельствуют в пользу прямого влияния ГМДП на нуклеосомный уровень структурной организации хроматиновых нитей в эукариотическом ядре, что коррелирует с данными о прямом взаимодействии ГМДП с гистонами H1 и H3.

ЖИВЫЕ ЭКВИВАЛЕНТЫ ТКАНЕЙ И СТВОЛОВЫЕ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ. © *А. В. Васильев, Е. А. Воротеяк, О. С. Роговая, Е. В. Киселева, Э. С. Черных, В. В. Терских.* Институт биологии развития РАН, Москва.

Современные возможности биомедицины определяют разнообразные подходы к лечению тканевых дефектов прежде всего с использованием факторов роста и разнообразных культивируемых клеток. В настоящее время стало очевидно, что для восстановления целого ряда тканей и органов требуются технологии с использованием стволовых клеток, а также считается доказанным, что многие тканеспецифичные стволовые клетки могут проявлять элементы пластичности и давать начало не только клеткам определенного типа в рамках их клеточной специализации, но и клеткам других типов тканей. Таким образом, поиск и разработка технологий ис-

пользования аутологичных стволовых клеток из доступных тканей, обладающих достаточной мультипотентностью, становятся критической биомедицинской проблемой. Важным основанием для применения клеточных технологий является принцип универсальности тканевых и клеточных эквивалентов. Мы нашли, что использование аллогенного живого эквивалента кожи, который является морфогенетическим и функциональным подобием кожи, позволяет достоверно и эффективно восстанавливать широкий спектр тканевых эпителио-мезенхимных дефектов. Принципы аллогенных трансплантатов и универсальности (пластичности) живого эквивалента кожи с аутологичными клетками являются новыми решениями, расширяющими сферу его применения. Нами изучены клеточные механизмы восстановления тканей трансплантацией аллогенных тканевых эквивалентов. Показано изменение экспрессии ряда регуляторных агентов — факторов роста, интерлейкинов, матриксных металлопротеиназ и компонентов внеклеточного матрикса, в частности базальной мембраны, под влиянием аллогенных тканевых трансплантатов. Таким образом, действие аллогенных трансплантатов основано на стимуляции репарации. В настоящее время показано, что стромальные клетки жировой ткани могут использоваться для восстановления сердечных сосудов, сердечной мышцы и костей у пациентов после инфаркта, инсульта и при остеопорозе. Обсуждается их применение для лечения фиброза легких, расстройств центральной нервной системы, несовершенного остеогенеза, мышц, а также хрящей, особенно при заболеваниях и травмах суставов и др. Таким образом, использование стромальных клеток жировой ткани в составе тканевых эквивалентов также является перспективным. Нами разработана оригинальная методика получения стромальных клеток жировой ткани. Показана возможность дифференцировки полученных клеток в адипоциты, клетки хряща и кости. Определены подходы объединения полученных клеток с биологическим матриксом в трехмерные эквиваленты. Используя модель живого эквивалента кожи, мы также изучили клеточные механизмы эпидермального морфогенеза. Разработка гистотипических конструкций, обогащенных тканеспецифическими стволовыми клетками, позволяет расширить границы применения разработанных нами ранее тканевых эквивалентов и, используя принципы морфологического подобия, применять их в восстановлении широкого круга тканевых повреждений — кожных, офтальмологических, костных дефектов, восстановлении гортани и уретры.

КЛЕТОЧНАЯ ПОТЕРЯ И РЕПАРАЦИЯ ДНК В МИОКАРДЕ МЫШЕЙ mdx И C57Bl ПОСЛЕ ДИНАМИЧЕСКОГО СТРЕССА. © *И. В. Веженкова, В. М. Михайлов.* Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Мыши mdx несут мутацию гена дистрофина, вызывающую отсутствие в сократительных клетках синтеза этого цитоскелетного белка. В свою очередь отсутствие дистрофина сопровождается возникновением в клетках состояния окислительного стресса, приводящего их к гибели. С этой точки зрения кардиомиоциты мышечной mdx являются перспективной моделью для изучения как выживаемости популяции терминально дифференцированных кардиомиоцитов, так и формирования кардиомиопатии в условиях окислительного стресса. Ранее было

установлено, что динамический стресс вызывает в миокарде мышей *mdx* образование низкомолекулярных фрагментов ДНК. Не вызывает сомнения, что фрагментация ДНК развивается через образование двухнитевых разрывов ДНК (ДР ДНК). Для регистрации динамики возникновения и исчезновения ДР ДНК в кардиомиоцитах мышей *mdx* после динамического стресса мы использовали иммуноморфологический метод при помощи антител к фосфорилированной форме гистона H2Ax (γ -H2Ax). При отсутствии стресса ДР ДНК в ядрах клеток миокарда обнаружены как у мышей C57Bl/6, так и у мышей *mdx* в 0.05 ± 0.07 и 6.7 ± 0.2 % соответственно. Через 1 ч после динамического стресса у мышей C57Bl/6 доля меченых ядер кардиомиоцитов возрастала до величины 1.0 ± 0.02 %, у мышей *mdx* — до 41.7 ± 11.4 %. Через 24 ч после стресса в миокарде мышей *mdx* оставались γ -H2Ax-положительными 5.2 ± 0.2 % ядер кардиомиоцитов. У кардиомиоцитов мышей C57Bl/6 меченые ядра не определялись. Известно, что выбранный нами вариант динамического стресса — плавание в холодной воде (12°C) в течение 5 мин — не приводит к гибели животных. При этом обнаружение гистона γ -H2Ax в ядрах кардиомиоцитов через 1 ч после динамического стресса возрастает до 41.7 %, что свидетельствует о значительном образовании в них ДР ДНК. Через 24 ч доля γ -H2Ax-положительных кардиомиоцитов уменьшается до 5.2 %. Этот результат ставит вопрос об участии репарации ДНК в выживаемости кардиомиоцитов. Для ответа на этот вопрос важно знать, имеет ли место потеря кардиомиоцитов через 24 ч после динамического стресса. Для определения уровня клеточной потери был выбран метод морфометрии. Получены данные о том, что через 24 ч после стресса клеточная потеря кардиомиоцитов в 1 мм^3 миокарда мышей *mdx* варьирует в пределах от 2.4 до 2.5 % по сравнению с исходной концентрацией кардиомиоцитов. Что касается мышей C57Bl/6, то через 24 ч после стресса общий уровень клеточной потери не превысил порога в 0.4 %. Полученные результаты имеют положительную корреляцию с ранее описанными нами сведениями о включении ^3H -тимидина в ядра кардиомиоцитов. Через 1 ч после динамического стресса 2.9 ± 0.5 % ядер кардиомиоцитов мышей *mdx* включают ^3H -тимидин. При регистрации включения через 24 ч после введения ^3H -тимидина доля меченых ядер кардиомиоцитов уменьшается до 0.4 ± 0.2 %. За прошедшие сутки в миокарде не отмечено митотической активности клеток какого-либо типа. Поэтому исчезновение меченых ^3H -тимидином кардиомиоцитов из клеточной популяции можно объяснить только их гибелью. Кроме того, необходимо отметить значительную разницу концентраций клеток миокарда у мышей C57Bl/6 и мышей *mdx*. Концентрации всех клеток миокарда, в частности кардиомиоцитов, у мышей C57Bl/6 выше. Это явление наблюдается как у контрольных животных, так и сохраняется у подопытных животных после стресса. Полученные данные позволяют предположить, что в процессе выживания кардиомиоцитов мышей *mdx* после динамического стресса задействован механизм репарации ДНК.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ МОЗГА И СЕТЧАТКИ В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ. © Б. А. Вердиев,¹ О. В. Подгорный,¹ Р. А. Полтавцева,¹ Р. Д. Зиновьева,¹ М. В. Марей,² Г. Т. Сухих,² В. И. Муташов,¹ М. А. Алек-

сандрова.¹ ¹ Институт биологии развития РАН, Москва, mariaaleks@inbox.ru, и ² Центр акушерства, гинекологии и перинатологии РАМН, Санкт-Петербург.

Нейральные стволовые клетки (НСК) относятся к группе тканеспецифических стволовых клеток, они имеют характеристики самоподдерживающейся популяции, при дифференцировке способны давать нервные клетки, астроциты и олигодендроциты в развивающемся мозге, во взрослом мозге и в культуре ткани. Чрезвычайно интересно, что на разных этапах развития мозга стволовые клетки принимают разные морфофункциональные облики. В эмбриогенезе это клетки нейроэпителлия и радиальной глии, а во взрослом мозге они проявляют свойства астроцитов. Текущие исследования позволяют полагать, что в ходе развития мозга стволовые клетки постепенно трансформируются из нейроэпителлиальных клеток в радиальную глию и далее в астроцитоподобные клетки. В то же время помимо центрального мозга из нейроэпителлия нервной трубки развиваются сетчатка и ее пигментный эпителий. В этих структурах также найдены клетки со свойствами стволовых, к ним относятся клетки Мюллеровой глии из зрительной части сетчатки и пигментные клетки из цилиарной области и самого пигментного эпителия. В нашем исследовании проведен сравнительный анализ этих тканей для оценки способности их клеток к самоподдержанию и мультипотентной дифференцировке в культуре ткани и при трансплантации с использованием морфологических и молекулярно-биологических методов. Образцы тканей, выделенные из мозга, сетчатки и цилиарной области глаза 10-недельных эмбрионов человека, культивировали в бессывороточной среде в присутствии митогенов FGF и EGF. ПЦР-анализ показал, что нативный мозг и сетчатка имели сходный паттерн экспрессии мРНК по маркерам дифференцировки (β -тубулину III, КГФБ и виментину) и транскрипционным факторам Pax6, Pbx1, Oct-4 и Nanog. В условиях суспензионного культивирования клетки формировали свободноплавающие шарообразные агрегаты — нейросферы, которые имели различия в структуре и составе клеток. В нейросферах из мозга сначала встречаются розетки нейроэпителлиальных клеток, но по мере роста клетки активно делятся, распределяются хаотично, среди них наряду со стволовыми и прогениторными всегда присутствуют клетки, дифференцирующиеся по нейрональному и глиальному типам. По мере культивирования клетки мозга утрачивали экспрессию транскрипционных факторов плюрипотентного статуса Oct-4 и Nanog, но сохраняли экспрессию Pax6, участвующего в регуляции клеточной пролиферации и нейрональной детерминации. Ретиносферы состояли из розеток фоторецепторных нейробластов и клеток вокруг них с высокой пролиферацией, организованных по типу эмбриональной сетчатки. В клетках ретиносфер наблюдалась экспрессия маркеров стволовых и прогениторных клеток, нейробластов и регуляторных генов Pax6, Pbx1, Oct-4 и Nanog. Нейросферы, полученные из клеток цилиарной области глаза, были сформированы из сильно- и слабопигментированных клеток с низкой пролиферативной активностью. При дифференцировке клетки сохраняли в цитоплазме пигментные гранулы и на их фоне демонстрировали экспрессию маркеров стволовых клеток, нейробластов и белка рековрина, специфичного для фоторецепторов сетчатки. Однако по морфологии эти клетки не соответствовали ни нейронам, ни фоторецепторным

клеткам. Результаты свидетельствовали о том, что клетки, выделенные из эмбрионального мозга и нейральной сетчатки, проявляли сходные потенциалы к самоподдержанию и мультипотентной дифференцировке в культуре ткани, в то время как пигментные клетки из цилиарной области сетчатки, скорее всего, демонстрируют способность к трансдифференцировке, а не стволовым свойствам.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 05-04-48031) и по программе президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

БАЛАНС ПОТОКОВ K^+ , Na^+ И Cl^- ЧЕРЕЗ ПЛАЗМАТИЧЕСКУЮ МЕМБРАНУ У КЛЕТОК ЛИМФОМЫ ЧЕЛОВЕКА U937 В НОРМЕ И ПРИ АПОПТОЗЕ. ИОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ АПОПТОЗНОЙ ДЕГИДРАТАЦИИ КЛЕТОК. © А. А. Веренинов,¹ Т. С. Горячая,¹ Ю. М. Розанов,¹ А. В. Широкова,¹ В. Е. Юринская,¹ Ф. Лонг,² А. А. Рубашкин.¹ ¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и ² Университет г. Тюбингена, Германия.

Сравнение потоков K^+ , Na^+ и Cl^- через плазматическую мембрану у пролиферирующих клеток в норме и при апоптозе дает уникальную возможность количественно охарактеризовать работу системы транспортеров и каналов, поддерживающей асимметричное распределение однозарядных ионов между цитоплазмой и средой, разность электрических потенциалов на плазматической мембране и водно-осмотический баланс клетки. Это становится возможным благодаря быстрому установлению ионного баланса у пролиферирующих клеток, вследствие чего можно сравнивать разные состояния баланса. На основе уравнений баланса можно провести расчет влияния отдельных трактов на поведение системы в целом и по интегральному эффекту проверять гипотезы, относящиеся к механизмам регуляции ионного и водного баланса клетки. Таким образом, исследование ионного баланса клеток при апоптозе представляет интерес не только в связи с изучением апоптоза, но и в связи с решением более общих проблем нормальной физиологии клетки. Нами проведено компьютерное моделирование баланса трансмембранных потоков K^+ , Na^+ и Cl^- , согласующееся с результатами измерения потоков ($(K^+(Rb^+), {}^{22}Na^+$ и ${}^{36}Cl^-)$) у клеток гистиоцитарной лимфомы человека U937 в двух состояниях — нормальном и при апоптозе, вызванном стауропоорином (1—2 мкМ, 4—5 ч). Полученные данные показывают, что полный поток Na^+ через плазматическую мембрану при апоптозе уменьшается в 1.8 раза, поток Na^+ через насос — в 2.2, а поток Na^+ через систему обмена 1 : 1 — в 1.7 раза; входной поток Na^+ через каналы, составляющий у нормальных клеток всего лишь 16 % полного потока, уменьшается при апоптозе в 1.5 раза, хотя доля его несколько возрастает (19 %); в выходном потоке Na^+ канальный компонент очень мал (менее 0.5 %); поток Na^+ через систему симпорта $Na^+—Cl^-$ составляет у нормальных клеток 8 % входного и 0.35 % выходного потоков Na^+ . Полный поток K^+ при апоптозе уменьшается в 1.6 раза при уменьшении входного потока K^+ через насос в 2.2 раза и небольшом увеличении входного потока K^+ через каналы (на 17 %). Наш анализ показывает, что выходной поток K^+ у исследованных клеток обусловлен движением его только через K^+ -каналы, тогда как во входном потоке 25 %

приходится на каналы и 75 % — на насос. Полный поток Cl^- у апоптозных клеток уменьшается в 1.4 раза, при уменьшении канального компонента в выходном потоке в — 1.9 и во входном потоке в — 1.4 раза. Поток Cl^- через систему обмена 1 : 1, составляющий у нормальных клеток 62 % всего потока, при апоптозе уменьшается в 1.4 раза. Поток Cl^- через систему симпорта $Na^+—Cl^-$ составляет у нормальных клеток 10 % входного и 0.4 % выходного потоков. Широко распространенное мнение о том, что снижение внутриклеточного содержания K^+ и связанная с этим апоптозная дегидратация клеток обусловлены открыванием K^+ -каналов (см. обзоры: Burg et al., 2006; Lang et al., 2006), не подтверждается ни математическим моделированием ионного баланса, ни прямыми измерениями потоков K^+ (Rb^+) (Веренинов и др., 2004, 2006). Ранее мы пришли к заключению о том, что апоптозная дегидратация клеток может быть обусловлена как сокращением $Na^+—Cl^-$ -симпорта, так и открыванием Cl^- -каналов (Vereninov et al., 2007). Измерения потоков ${}^{36}Cl^-$ у клеток U937, проведенные нами в последнее время, показывают, что второе предположение не проходит. По нашему анализу, изменение ионного баланса при апоптозе исследованных клеток и характерное для апоптоза дегидратационное уменьшение их объема обусловлены сочетанием снижения активности $Na,K-ATP$ -азного насоса, уменьшения интегральной проницаемости Na^+ -каналов и сокращения $Na^+—Cl^-$ -симпорта. Разработанный подход к расчету баланса потоков K^+ , Na^+ и Cl^- через плазматическую мембрану клеток U937 может быть использован и в других случаях, когда имеют место медленные физиологические изменения ионного состава клеток, как это происходит, например, при переходе клеток к пролиферации. Столь полного анализа баланса ионных потоков у пролиферирующих клеток до сих пор не проводили.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 06-04-48060 и 06-04-04000 РФФИ-ННИО (436 RUS) 113/488/0-2R) и С.-Петербургского научного центра РАН (проект А. А. Веренинова).

РОЛЬ БЕЛКА HP1 α И ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ ГИСТОНОВ В ОРГАНИЗАЦИИ КОНСТИТУТИВНОГО ГЕТЕРОХРОМАТИНА. © П. Н. Вихрева,^{1,2} С. А. Гольшев,¹ Г. И. Кирьянов,¹ В. Ю. Поляков.¹ ¹ Институт физико-химической биологии Московского государственного университета и ² Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета, polina266@gmail.com.

Несмотря на многочисленные исследования, способ компактизации ДНК в интерфазных и митотических клетках остается неизвестным. Перспективной моделью для анализа структурной организации интерфазного хроматина являются так называемые хромоцентры — структуры, содержащие высокоповторяющиеся последовательности сателлитной ДНК, гистоны и негистоновые белки. Маркерным белком хромоцентров является HP1 α , который, по некоторым данным, играет важную роль в инактивации экспрессии генов (гетерохроматинизации). В настоящей работе изучали роль белка HP1 α в структурной организации хромоцентров. В качестве экспериментального подхода использовали гипотоническую обработку, которая приводит к декомпактизации и после-

дующей реконструкции хроматина, и воздействие ингибитором активности деацетилаз гистонов — трихостатином А (TSA). В соответствии с данными литературы показано, что при окраске интактных клеток флуорохромом DAPI хромоцентры представлены гомогенно окрашенными блоками округлой формы. Белок HP1 α выявляется в составе хромоцентров, полностью колокализуясь с зонами максимальной концентрации ДНК. После 24 ч инкубации клеток с TSA в концентрации 50 нг/мл HP1 α удаляется из хромоцентров. Гипотоническая обработка (60 мин инкубации в 30%-ном растворе Хэнкса) интактных клеток приводит к набуханию и последующей частичной реконструкции хромоцентров, но не удаляет HP1 α . В клетках, инкубированных 24 ч в присутствии TSA, гипотоническая обработка приводит к декомпактизации хромоцентров, аналогичной гипотонической обработке без трихостатина. Обработка клеток трихостатином в течение 48 ч и последующее гипотоническое воздействие приводят к драматическим изменениям в структуре хромоцентров. В 80 % клеток под воздействием гипотонического раствора хромоцентры реконструируются в фибриллы, преимущественно замкнутые в кольцеобразные структуры. Приблизительно 20 % клеток содержат ядра с полностью деконденсированным хроматином, где хромоцентры нельзя выявить как обособленные структуры. Таким образом, на основании полученных данных можно предполагать, что в условиях отсутствия HP1 α и гиперацетилирования гистонов реконструкция хроматина хромоцентров происходит по пути, отличающемуся от такового для нативного хроматина. Полученные данные обсуждаются в связи с гипотезой о структурной роли HP1 α и других негистоновых белков в организации хромоцентров.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-49506-а).

ФОРМИРОВАНИЕ ЭКТОПИЧЕСКОГО МЕЖДИСКА В ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМАХ *Drosophila melanogaster* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ FRT-СОДЕРЖАЩИХ КОНСТРУКЦИЙ. © Е. И. Волкова, О. В. Андреенков, В. Ф. Семешин, С. А. Демаков. Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск.

Вопрос о том, какие последовательности необходимы для формирования междисков политенных хромосом дрозофилы, до сих пор остается открытым. Нами для выяснения этого вопроса предложен подход, который основан на электронно-микроскопическом картировании изменений морфологии конкретного района политенной хромосомы при встраивании в него тестируемых последовательностей ДНК из района междиска. Метод предполагает использование двух транспозонов. Транспозон-донор несет исследуемую последовательность ДНК, фланкированную двумя сайтами FRT.

Транспозон-мишень состоит из последовательностей ДНК, разделенных сайтом FRT, которые формируют в составе хромосомы новый диск. При сведении этих транспозонов в геноме с источником FLP происходят вырезание исследуемой последовательности из донорного транспозона и ее встраивание в акцепторный транспозон по сайту FRT (Golic et al., 1997). Нами предложена генетическая схема для селекции подобного рода собы-

тий. Донорная конструкция pFRTV-3C, содержащая между сайтами FRT фрагмент ДНК из междиска 3C6/7 и маркерный ген *vermilion* (*v*), была трансформирована во 2-ю хромосому. Конструкция-мишень pICon(dv) Δ была картирована в 3-й хромосоме, маркированной мутацией *Kinked* (*Ki*). Присутствие в составе конструкции-мишени нефункциональной последовательности гена *vermilion* (*dv*) значительно повышает частоту встраивания кассеты-донора за счет гомологии с ДНК этого гена (Golic et al. Nucl. Acids Res., 1997, 25: 3665—3671). Селекцию проводили на фоне системы мутаций *v*²; *bw*^d, которая позволяет по изменению цвета глаз (белый—коричневый) регистрировать события вырезания—встраивания кассеты с геном *vermilion*. Самцов $\beta 2Tb$ -FLP, pFRTV-3C/+; pICon(dv) Δ *Ki*+/+, содержащих источник FLP под β -тубулиновым промотором, скрещивали с самками *v*²; *bw*^d/*CyO*. В потомстве отбирали самцов *bwKi*, индивидуально скрещивали вновь с самками *v*²; *bw*^d/*CyO* и селективно регистрировали события интеграции в транспозон-мишень pICon(dv) Δ по генетическому сцеплению признака «коричневые глаза» (*v*²; *bw* [*v*⁺]) с маркером *Ki*. Частота вырезания кассеты с маркером *v*⁺ в системе $\beta 2Tb$ -FLP—FRT составила более 95 %, а частота ее встраивания в транспозон pICon(dv) Δ — около 2 % (3/146). Таким образом, данная генетическая схема позволяет среди всех возможных вариантов событий в системе FRT—FLP рекombинации эффективно отбирать события интеграции нужной кассеты, содержащей фрагмент междиска, в конструкцию-мишень. Дальнейшее электронно-микроскопическое картирование позволит определить степень автономности исследуемых последовательностей из района междиска 3C6/7. Если в составе акцепторного транспозона встраивание будет сопровождаться образованием междиска, это будет свидетельствовать о том, что данная последовательность необходима и достаточна для формирования междиска. Достоинством данного генетического подхода является универсальная возможность встраивать в стандартную конструкцию-мишень различные последовательности ДНК и изучать их свойства в заданном геномном окружении.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 06-04-4838), в виде гранта НШ-942.2006.4, по программе президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (грант 10.1) и по Междисциплинарному интеграционному проекту СО РАН № 45.

УЧАСТИЕ ОПУХОЛЕВОГО СУПРЕССОРА p53 В ИНДУКЦИИ ЭРИТРОИДНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК ЛИНИИ K562. © Т. О. Волкова, Н. С. Зыкина, Н. Н. Немова. Петрозаводский государственный университет.

В настоящее время показано, что опухолевый супрессор p53 играет ключевую роль в регуляции клеточной пролиферации. В ответ на различные повреждающие агенты концентрации белка p53 в клетке резко возрастает, что приводит к остановке клеточного цикла в G₁-периоде и(или) запуску процессов апоптоза. Однако модуляция экспрессии p53 может иметь место также при индукции клеточной дифференцировки. Нарушение функции указанного белка является наиболее часто

встречаемым молекулярным изменением в опухолевых клетках. Для более 50 % опухолей различного происхождения характерными являются мутации в ДНК-связывающем домене p53. Поэтому вопрос о роли мутантных форм белка p53 в регуляции основных клеточных процессов является весьма значимым и имеет огромное практическое значение. В представленной работе нами были изучены особенности дифференцировки клеток родительской линии K562 и ее сублинии, экспрессирующей температурочувствительный (ts) мутантный мышечный p53 Val-135, который при 37 °C имеет типичные характеристики мутантного белка p53, а при 32 °C приобретает конформацию и свойства белка дикого типа (сублиния любезно предоставлена проф. Б. П. Копниным, Онкологический научный центр РАМН). Клетки ($5 \cdot 10^5$ клеток в 1 мл) инкубировали в среде с 2 мМ тимидина при 32 °C в течение 2 сут, после чего определяли концентрацию гемоглобина — маркера, специфичного для клеток эритроидного ряда. Результаты исследования показали, что концентрация гемоглобина в клетках сублинии K562/ts-p53, обработанных реагентом, была в 3 раза выше, чем в клетках родительской линии. Кроме того, в используемых нами условиях у 10—20 % клеток K562/ts-p53 наблюдались признаки апоптоза, тогда как среди родительских клеток доля погибших составляла 2—3 %. Апоптоз регистрировали методами электрофореза ДНК в агарозе и двухпараметровой флуоресценции с 4,6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) и этидий бромидом (EtBr). В работе обсуждается способность мутантного p53 в определенных условиях сохранять некоторые активности белка дикого типа, а именно связываться с p53-респонсивными элементами и увеличивать транскрипцию репортерных генов, экспрессирующихся в процессе дифференцировки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда президента РФ по поддержке ведущих научных школ РФ (грант НШ-4310.2006.4) и ФЦНТП «Ведущие научные школы».

ВЛИЯНИЕ НИТРОСТИРИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХИНОЛИН-1-ОКСИДА НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЭРИТРОЛЕЙКЕМИЧЕСКИХ КЛЕТОК K562 К НЕСПЕЦИФИЧЕСКОМУ ЛИЗИСУ ЛЕЙКОЦИТАМИ ЧЕЛОВЕКА. © Т. О. Волкова, Н. Н. Немова. Петрозаводский государственный университет.

Способность естественных киллерных клеток, а также других субпопуляций эффекторов осуществлять неспецифический цитотоксический лизис (НЦТ-лизис) клеток-мишеней во многом определяется рецепторными структурами на поверхности клеток, обуславливающими их взаимодействие. К числу таких структур относятся, например, антигены главного комплекса гистосовместимости класса I, экспрессия которых может меняться как при опухолевой трансформации клеток *in vivo*, так и при спонтанной и индуцированной дифференцировке *in vitro*. Поэтому правильный выбор цитостатических агентов в клинической практике определяет эффективность химиотерапии. В настоящей работе нами изучено изменение чувствительности клеток K562 к НЦТ-лизису лейкоцитами периферической крови (ЛПК) человека при индукции эритроидной дифференцировки в условиях обработки N-оксидированными производными хино-

лина [2-(4'-нитростирил)хинолин-1-оксид] (2-NSQO) и 4-(4'-нитростирил)хинолин-1-оксид] (4-NSQO)], а также комбинациями указанных реагентов с диметилсульфоксидом (ДМСО). Обработку клеток реагентами проводили в течение 2 и 4 сут инкубации. Результаты исследования показали, что при обработке опухолевых клеток 2-NSQO или 4-NSQO в концентрации 1 мкМ чувствительность их к литическому действию ЛПК значимо возросла ($P < 0.05$). Эффект наблюдался на 4-е сут инкубации с реагентами. Однако добавление в систему ДМСО (0.5 %) приводило к достоверному снижению чувствительности клеток K562 к НЦТ-лизису ЛПК ($P < 0.05$) по сравнению с вышеописанным вариантом. Кроме того, нами установлено, что при использовании комбинаций соединений также происходило подавление апоптоза в опухолевых клетках. В работе обсуждается возможная взаимосвязь между выбором направления дифференцировки опухолевых клеток и изменением чувствительности к НЦТ-лизису гомологичными клетками-эффекторами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда президента РФ по поддержке ведущих научных школ РФ (грант НШ-4310.2006.4) и ФЦНТП «Ведущие научные школы».

ДИНАМИКА МИКРОТРУБОЧЕК В ЖИВОЙ КЛЕТКЕ: СВОЙСТВА РАДИАЛЬНОЙ СЕТИ И КРАЕВОЙ ЭФФЕКТА. © И. А. Воробьев,^{1,2} И. С. Григорьев,² И. В. Малый.³ ¹ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии Московского государственного университета, ivorobjev@mail.ru, ² Департамент клеточной биологии и генетики, Медицинский центр им. Эразма в Роттердаме, Голландия, и ³ Департамент вычислительной биологии, Медицинский факультет, Университет г. Питтсбурга, США.

Микротрубочки (МТ) играют центральную роль в поддержании архитектуры, организации движения и деления клеток. В интерфазе длинные МТ образуют во многих культивируемых клетках радиальную сеть, где плюс-концы обращены к краю клетки, а минус-концы закреплены на центросоме или находятся вблизи нее. Индивидуальные МТ все время растут и укорачиваются, в то время как статистическое распределение длин МТ в клетке остается приблизительно постоянным. Мы предлагаем модель, которая описывает отношение средней длины МТ и динамики их плюс-концов в стационарном состоянии в клетке с использованием минимального набора параметров (радиус клетки, концентрация тубулина, критическая концентрация для удлинения плюс-конца и число сайтов нуклеации). Сеть МТ аппроксимируется радиальной системой, в которой минус-концы ассоциированы с затравками на центросоме, в то время как плюс-концы растут и укорачиваются. Динамическая нестабильность плюс-концов МТ рассматривается как случайное блуждание с красвыми условиями, поведение сети МТ количество характеризуется коэффициентами диффузии и сноса. Мы показываем, что формирование протяженной сети в стационарном состоянии может быть достигнуто одним лишь ограничением роста микротрубочек краем клетки и не требует локальной регуляции их поведения. Для радиуса клетки, концентрации тубулина, критической концентрации элонгации

плюс-конца и числа сайтов нуклеации мы определили базисную точку в пространстве параметров, в которой плюс-концы индивидуальных МТ в среднем не удлиняются и не укорачиваются. В этом случае средняя длина МТ равна половине радиуса клетки. Когда какой-либо из параметров уклоняется от своего базисного значения, МТ в среднем становятся длиннее или короче; соответственно возникает положительный или отрицательный снос плюс-концов. Изменение любого параметра в окрестности базисной точки существенно влияет на длину МТ и слабо — на величину сноса. Если средняя длина МТ близка к радиусу клетки, то снос плюс-концов становится значительным. Это приводит к тому, что большинство плюс-концов располагается вблизи края клетки, а немногочисленные МТ, имеющие плюс-концы во внутренней цитоплазме, демонстрируют процессивный рост. Стабилизация плюс-концов на краю клетки является в рамках модели результатом большого положительного сноса и не требует предположений о наличии локальных стабилизирующих факторов. Экспериментальный анализ динамики плюс-концов МТ в различных клеточных культурах (фибробласты 3Т3, клетки HeLa, СНО, меланофоры рыб и др.) показывает, что в большинстве клеток с радиальной системой протяженных МТ плюс-концы имеют заметный положительный снос, что согласуется с наличием длинных МТ в рамках предлагаемой теории. Наличие свободных (деполимеризующихся) минус-концов на небольшой части МТ не приводит к заметному изменению параметров системы (снова и диффузии плюс-концов), однако существенно уменьшает время обновления длинных МТ. Экспериментами по анализу кинетики восстановления флуоресценции после обесцвечивания показано, что в клетках, радиус которых не превосходит 20—25 мкм, обновление большинства МТ происходит за счет деполимеризации плюс-концов, тогда как для более длинных МТ основным источником обновления является деполимеризация минус-концов. Показано, что использование параметров диффузии и сноса позволяет выявить различные эффекты воздействия на МТ регуляторных ГТФаз (Rho-белков), а также стабилизирующих факторов (белков семейства CLASP).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-49847-а).

МАТРИКСНЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ МОГУТ БЫТЬ МИШЕНЬЮ ДЕЙСТВИЯ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА НА ТРАНСФОРМИРОВАННЫЕ ФИБРОБЛАСТЫ 3Т3-SV40. © И. В. Воронкина, Л. В. Смагина, К. М. Куртичичикова, И. А. Гамалей. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, igamaley@mail.cytspb.rssi.ru.

Такие антиоксиданты, как N-ацетилцистеин (НАС) и глутатион, в отличие от липоевой кислоты, действуя на мышинные фибробласты 3Т3, трансформированные вирусом SV40 (3Т3-SV40), вызывают временную частичную нормализацию (реверсию) их трансформированного фенотипа. Реверсия выражается, с одной стороны, в приобретении клетками 3Т3-SV40 структур актинового цитоскелета, похожих на стресс-фибриллы нормальных клеток 3Т3, а с другой — в потере их чувствительности к бактериальной инвазии и литическому действию естественных киллерных клеток (Гамалей и др., 2006; Gamaley

et al., 2006). НАС и глутатион принципиально отличаются от липоевой кислоты наличием в своей структуре восстановленных SH-групп и действуют как антиоксиданты и экстраклеточно, и после проникновения в клетку. Липоевая кислота восстанавливает свои SH-группы ферментативно лишь внутри клетки и действует как антиоксидант исключительно внутриклеточно. Мы показали, что все три антиоксиданта уменьшают содержание в клетках активных форм кислорода и увеличивают пул восстановленного глутатиона. Однако различные морфологические и функциональные изменения клеток, вызванные их присутствием, свидетельствуют в пользу разных мишеней их действия, прямо не связанных с изменениями общего редокс-баланса клетки. Исходя из этого в данной работе мы попытались найти мишень действия НАС на поверхности клеток 3Т3-SV40. Исследовали активность матриксных металлопротеиназ (ММП) — желатиназ ММП2 и ММП9, наиболее часто секретируемых опухолевыми и трансформированными клетками. ММП, будучи маркерами опухолевой прогрессии, являются белками, чувствительными к редокс-окружению благодаря цистеиновому остатку в пропептидном домене белка, через который может происходить активация или ингибирование ММП. Активность ММП2 и ММП9 в экстраклеточной среде исследовали с помощью зимограмм. Показано, что в результате действия 10 мМ НАС (но не липоевой кислоты) резко уменьшается количество обеих ММП в среде, что говорит об их чувствительности к действию НАС. Введение же специфического ингибитора ММП GM6001 (30 нМ) приводит, наоборот, к выбросу клетками большого количества ММП2, но в латентной форме. При совместном действии НАС и GM6001 превалирует действие НАС, что свидетельствует о том, что НАС является не простым (и не только) ингибитором активности ММП. Отсутствие ММП (как в активной, так и в неактивной формах) в среде культивирования клеток в присутствии НАС позволяет предположить, что ММП в результате действия НАС могут оставаться на мембране клеток и изменять ее поверхностные и другие свойства.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-48586).

ХАРАКТЕРИСТИКА НИКОТИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ АЦЕТИЛХОЛИНА В НЕЙРОНАХ МОЛЛЮСКА ПО ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОМУ ПРОФИЛЮ. СРАВНЕНИЕ С НЕЙРОНАЛЬНЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ ПОЗВОНОЧНЫХ. © Е. А. Вульфус,¹ Е. В. Горбачева,¹ О. Б. Тумина,¹ И. Е. Кашеверов,² М. Н. Жмак,² Ю. Н. Уткин,² В. И. Цетлин.² ¹ Институт биофизики клетки РАН, Пущино, vulfius@icb.psn.ru, и ² Институт биоорганической химии РАН, Москва.

Никотиновые рецепторы ацетилхолина (НРАХ) относятся к суперсемейству лигандуправляемых ионных каналов, представляющих собой пентамерные белки. Пять субъединиц сгруппировано вокруг ионной поры, которая открывается для потока ионов в результате конформационного изменения при связывании ацетилхолина (АХ) или его агониста с узнающим участком. Идентифицировано и клонировано 12 подтипов субъединиц нейрональных НРАХ позвоночных (9 α и 3 β). Сборка субъединиц в разных комбинациях и посттрансляцион-

ная модификация рецепторов определяют многообразие их свойств. При сравнении чувствительности нейронов к агонистам и антагонистам с чувствительностью рекомбинантных НРАХ заданного состава можно сделать предположение о субъединичном составе нативных НРАХ. Применяв этот подход для исследования С1-проводящих НРАХ в идентифицированных нейронах брюхоногого моллюска *Lymnaea stagnalis*, мы нашли большее сходство около 80% рецепторов с гомоолигомерным $\alpha 7$ -рецептором позвоночных: 1) ток, вызванный АХ (I_{AX}), подавляется длинным α -нейротоксином из яда кобры; известно, что длинные α -нейротоксины имеют высокое сродство только к $\alpha 7$ -, $\alpha 8$ - и $\alpha 9$ -подтипам нейрональных НРАХ позвоночных (Couturier et al., 1990; Elgouhen et al., 1994; Gerzanich et al., 1994); 2) I_{AX} высокочувствителен к α -конотоксину ImI — избирательному антагонисту $\alpha 7$ и $\alpha 3\beta 2$ НРАХ (Johnson et al., 1995; Ellison et al., 2004), но не снижается в присутствии α -конотоксина MII, специфичного в отношении $\alpha 3\beta 2$ -рецепторов (Cartier et al., 1996); 3) I_{AX} блокируется двумя синтетическими аналогами α -конотоксина PnIA с заменой Ala¹⁰ на Leu и Asp¹⁴ на Lys; изменение избирательности с $\alpha 3\beta 2$ -подтипа на $\alpha 7$ -подтип НРАХ позвоночных при мутации A10L в PnIA показано ранее (Hogg et al., 1999; Luo et al., 1999); 4) цитизин и холин являются полными агонистами, что характерно только для $\alpha 7$ - и $\alpha 8$ -подтипов НРАХ (Bertand et al., 1992; Gerzanich et al., 1994; Papke et al., 1996; Alkondon et al., 1997), и ответы на них подавляются ImI. Фармакологическое сходство быстро десенситизирующей компоненты С1-тока, вызванного АХ, с $\alpha 7$ -гомомерами НРАХ позвоночных было обнаружено в нейронах голожаберного моллюска *Aplysia* (Кеhoe, McIntosh, 1998). Популяция $\alpha 7$ -подобных НРАХ нейронов прудовика негомогенна: на двух группах клеток IC₅₀ для ImI различается в 30 раз. Введение положительного заряда в С-конец α -конотоксина [A10L]PnIA при замене Asp¹⁴ на Lys повышает его активность в 50 раз в отношении НРАХ с более высокой чувствительностью к ImI, но не изменяет ее на клетках с относительно низкой чувствительностью к ImI. Ранее (Celie et al., 2005) было обнаружено повышенное сродство [A10L,D14K]PnIA по сравнению с [A10L]PnIA к α -НРАХ, экспрессированным в ооцитах *Xenopus*, и АХ-связывающему белку из мозга *L. stagnalis*, который используется как модель экстраклеточного домена нейронального НРАХ. Несмотря на некоторые отличия двух $\alpha 7$ -подобных подтипов НРАХ идентифицированных нейронов прудовика от истинных $\alpha 7$ -рецепторов позвоночных, эти клетки можно использовать для предварительного тестирования потенциальных избирательных агентов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 03-04-48732 и 06-04-49198).

ВЛИЯНИЕ ХЕХСТА 33342 НА ПРОХОЖДЕНИЕ ПО КЛЕТОЧНОМУ ЦИКЛУ КЛЕТОК ЛИНИИ L929.
© Е. В. Гаврилова, Н. Д. Аксенов, А. Н. Шатрова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, gav1982@mail.ru.

Хехст 33342 известен как прижизненный ДНК-флуорохром, который интеркалирует в малую бороздку ДНК. Краситель в сочетании с другими флуорохромами применяют для оценки жизнеспособности клеточных попу-

ляций, для количественной оценки доли клеток, находящихся в разных фазах клеточного цикла (FACS-анализ), а также для синхронизации клеток на границе фаз G₂M клеточного цикла. Свойство специфически связываться с АТ-парами оснований широко используется для выявления АТ-богатых внутриядерных структур, например хромоцентров. Известно, что Хехст 33342 тормозит активность топоизомераз I и II и, таким образом, оказывает влияние на прохождение клеток по клеточному циклу. Нарушения клеточного цикла могут вызвать изменения динамики организации хромоцентров. Поэтому необходим поиск оптимальной концентрации красителя для одновременной прижизненной визуализации хромоцентров на различных этапах клеточного цикла при минимизации влияния красителя на метаболизм ДНК и соответственно на нормальное прохождение клеток по циклу. Целью настоящей работы было исследование влияния различных концентраций Хехст 33342 на прохождение по циклу клеток линии L929. В работе мы использовали клетки линии L929, предварительно синхронизированные в фазах G₀/G₁ лишением сыворотки в течение 48 ч. Синхронизированные клетки обрабатывали Хехстом 33342 в течение 1 ч при 37 °С, отмывали от красителя и запускали по циклу путем добавления ростовой среды. Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла проводили методом проточной цитофлуориметрии. При концентрациях от 0.1 до 5.0 мкг/мл краситель вызывает замедление прохождения клетками фаз G₀/G₁ → S → G₂ дозозависимым образом с ярко выраженным торможением входа и прохождения S-фазы. Однако даже через 24 ч после запуска клеток по циклу клетки продолжали оставаться в G₂-фазе, о чем свидетельствуют микроскопические данные (отсутствие митотических клеток). При понижении концентрации красителя от 0.100 до 0.001 мкг/мл наиболее оптимальный эффект наблюдался при концентрации 0.04 мкг/мл. Такие условия позволили четко визуализировать хромоцентры в клетках, синхронизированных в фазах G₀/G₁, при минимальном влиянии на дальнейшее прохождение клеток по циклу. При меньших концентрациях красителя визуализация ядерных структур клеток затруднена. Таким образом, мы показали, что Хехст 33342 при концентрации 0.04 мкг/мл не препятствует прохождению клеток линии L929 по циклу, одновременно позволяя визуализировать хромоцентры.

КЛОНИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ ТРАНСПОЗОНА *mariner* ИЗ ГЕНОМА ПАРАЗИТИЧЕСКОГО ПЛОСКОГО ЧЕРВЯ *Humasthla elongate*. © Н. К. Галактионов, А. В. Федоров, О. И. Подгорная. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, gnickkolas@gmail.com.

Мобильные элементы семейства *mariner* широко распространены в геномах представителей разных систематических групп. Элементы *mariner* являются ДНК-транспозонами, они имеют длину около 1300 п. н. и содержат одну открытую рамку считывания, кодирующую транспозазу. Нуклеотидные последовательности элементов *mariner* у разных видов существенно различаются, тем не менее анализ аминокислотных последовательностей транспозазы позволил выявить в их составе консервативные для всех представителей семейства *mariner* домены. В настоящей работе для поиска элементов семейства *mariner* у представителей паразитических червей класса Trematoda — *Humasthla elongate* — мы использовали из-

вестный продуктивный подход ПЦР-анализа с вырожденными праймерами к консервативным участкам гена транспозазы. Этот подход показал наличие в геноме *H. elongate* транспозонов *mariner*. Секвенирование полученного ПЦР-продукта позволило определить нуклеотидную последовательность центральной части гена транспозазы длиной 484 п. н. С помощью компьютерного анализа было установлено, что эта последовательность содержит консервативный транспозазный домен и высокогомологична соответствующему участку элемента *mariner* из генома пресноводной турбеллярии *Dugesia tigrina*. Особенностью транспозонов *mariner* является наблюдаемая высокая степень гомологии первичных последовательностей ДНК этих элементов из геномов некоторых неродственных видов; в то же время известны примеры отсутствия транспозонов *mariner* у одного из близких видов. Для объяснения этого явления была предложена гипотеза горизонтального переноса транспозонов *mariner*. Одними из модельных объектов для изучения явления горизонтального переноса являются системы паразит—хозяин. В настоящей работе методом дот-блоттинга определено количество элементов *mariner*, гомологичных выявленной последовательности, в геноме *H. elongate*. При этом установлено, что геномы промежуточных хозяев *H. elongate* (моллюсков *Mytilus edulis*, *Littorina littorea* и *L. saxatilis*) и окончательного хозяина (чайки *Larus argentatus*) не содержат значительных количеств транспозонов, гомологичных элементу *mariner* из генома *H. elongate*.

БЕЛКОВЫЙ СОСТАВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА, ПРОДУЦИРУЕМОГО ФИДЕРНЫМИ ФИБРОБЛАСТАМИ В КУЛЬТУРЕ. © Д. А. Гамазин, А. М. Кольцова, Т. А. Крылова, И. В. Воронкина. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, dklimenok@mail.ru.

При культивировании клеток человека *in vitro* важнейшей задачей является воссоздание специфического микроокружения, способствующего сохранению основных свойств данного клеточного типа. В случае культивирования *ex vivo* стволовых клеток — эта проблема сохранения плюрипотентности и предотвращения дифференцировки. В практике работы с клетками человека получили распространение фидерные клетки, синтезирующие компоненты внеклеточного матрикса (ВКМ), служащие подложкой для посева колоний стволовых клеток. ВКМ разных тканей различается как соотношением разных типов макромолекул, так и способом их организации. Основными продуцентами ВКМ являются фибробласты; известно, что при совместном культивировании дермальных фибробластов и кератиноцитов создается аналог базальной мембраны (БМ), специализированного варианта ВКМ. Основные компоненты БМ — гликопротеины коллаген IV и ламинин, адгезивный белок фибронектин, а также гепарансульфатсодержащий протеогликан перлекан. В настоящей работе изучен качественный состав матрикса, продуцируемого фидерными клетками человека в культуре. Эмбриональные мышечные и мезенхимные фибробласты и кожные фибробласты крайней плоти выращивали в течение 2 нед после метастазирования блока, после чего клетки снимали 0.5%-ным дезоксихолатом натрия, ВКМ фиксировали и выявляли его белковые компоненты методами непрямой иммунофлуоресценции и конфокальной микроскопии. Удалось показать, что ВКМ, продуцируемый фидерными

ми фибробластами, не является однородной «подложкой», а представляет собой сложную трехмерную структуру, состав и пространственная организация которой различны. Во всех препаратах ламинин и фибронектин выявляются главным образом в перичеллюлярном пространстве, образуя «каркас», соответствующий очертаниям и размерам фибробласта. Отмечена большая плотность сети ламинина, а также мерозина ($\alpha 2$ -ламинина), в то время как фибронектин образует более регулярные прямые фибриллы. В препаратах мышечных фибробластов присутствуют более протяженные фибронектиновые волокна, иногда более 100 мкм длиной. Обращает на себя внимание преобладание ламинина над фибронектином в субстрате, образованном фибробластами крайней плоти. Эмбриональные мышечные фибробласты продуцируют длинные (до 60 мкм и более) волокна интерстициальных коллагенов (типов I, II и III). В матриксе, образованном фибробластами кожи, также обнаруживается коллаген I, но характерных волокон он не формирует. В препарате мезенхимных клеток выявить интерстициальные коллагены не удалось. Отмеченная протяженность коллагеновых и фибронектиновых волокон в случае эмбриональных мышечных фибробластов может быть связана с большей подвижностью этих клеток. Наиболее заметна разница в распределении специфического для БМ коллагена IV. Лишь в препарате эмбриональных мышечных фибробластов этот (нефибрилярный) коллаген образует достаточно протяженные волокна, в то время как в других двух линиях клеток он выявляется лишь в перичеллюлярном пространстве — подобно ламинину и фибронектину. В наибольшем количестве коллаген IV присутствует в ВКМ, синтезированном фибробластами крайней плоти. С помощью доступных антител достоверно выявить коровий белок перлекана не удалось. Относительную локализацию белков определили с использованием двойного иммунофлуоресцентного окрашивания. Различия в синтезе компонентов ВКМ фибробластами разного происхождения подтверждены методом иммуноблоттинга. В дальнейшем это позволит количественно оценить уровень синтетической активности фидерных клеток. Образующий таким образом ВКМ будет использован для посева стволовых клеток. Поведение их на новосинтезированном либо модифицированном каким-либо образом (введение дополнительных белков, обработка матриксными металлопротеиназами) матриксе будет служить функциональным «тестом на нативность» такого субстрата.

РАСПЛАСТЫВАНИЕ КЛЕТОК A431 НА КОМПЛЕКСАХ БЕЛКОВ БАЗАЛЬНОЙ МЕМБРАНЫ. © Д. А. Гамазин, Е. Б. Ревнова, И. В. Воронкина, Г. П. Пинаев. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, dklimenok@mail.ru.

Внеклеточный матрикс ВКМ играет важную роль в регуляции клеточных функций, влияя на форму клеток, их пролиферацию и дифференцировку в процессе морфогенеза и при регенерации органов и тканей. Структурные и адгезивные белки ВКМ, а также протеогликаны, взаимодействуя между собой, образуют сложную трехмерную структуру, к которой прикрепляются клетки. Различия в соотношении разных типов макромолекул и в способе их пространственной организации приводят к образованию разнообразных форм матрикса, отвечаю-

ших потребностям разных тканей. Базальная мембрана (БМ) — специализированный барьерный вариант ВКМ; основные ее компоненты — коллаген IV, изоформы ламинина, фибронектин и гепарансульфатсодержащий протеогликан перлекан. Несмотря на большое количество работ, посвященных характеристике взаимодействий отдельных белков БМ с клеточными рецепторами, до настоящего времени остается неясным, какую роль в процессах адгезии играют межмолекулярные взаимодействия компонентов БМ. Вполне возможно, что различный качественный состав или количественное соотношение белков и протеогликанов БМ может являться ключевым фактором регуляции пролиферации и дифференцировки клеток разных типов. Кроме того, состав и пространственная организация ВКМ могут меняться под влиянием матриксных металлопротеиназ, секретируемых окружающими клетками при физиологической регенерации либо при заживлении повреждений. В настоящей работе фибронектин, ламинин 2/4, коллаген IV, протеогликан перлекан, а также их двухкомпонентные комплексы разного состава использовали для изучения адгезии и распластывания клеток эпидермоидной карциномы линии A431. Ламинин, коллаген и перлекан выделяли по известным методикам из EHS-саркомы, перевиваемой в мышах, фибронектин — из плазмы крови человека. Клетки наносили на силиконизированные стекла, покрытые компонентами БМ, инкубировали в течение 1 ч, фиксировали и выявляли в препаратах актиновый цитоскелет, а также распределение белков ВКМ. Как и ожидалось, форма клеток и структура цитоскелета различаются в зависимости от субстрата. Среди клеток, распластанных на фибронектине, преобладают округлые клетки с тонкими периферическими пучками актиновых филаментов; обнаруживаются клетки с фокальными контактами и стресс-фибриллами. Морфология клеток A431, адгезировавших к ламинину 2/4, иная: выражена полярность, все клетки имеют широкую ламеллу. Впервые изучена адгезия клеток A431 к коллагену IV и перлекану. На коллагене IV преобладает неполярный морфотип, центральная часть клеток оторочена широкой складчатой полосой цитоплазмы; предполагается наличие раффлов. При использовании двухкомпонентных смесей белков БМ распластывание клеток A431 не носит «промежуточного» характера. Характер распластывания зависит от количественного состава макромолекулярных комплексов. Так, при равном соотношении компонентов эффект фибронектина оказывается более выраженным. Детальное исследование структуры актинового цитоскелета в клетках, распластанных на многокомпонентных комплексах белков БМ, и сопоставление результатов с выявленными ранее морфологическими типами клеток A431 в дальнейшем позволят охарактеризовать роль каждого из компонентов и предложить модель поведения клеток при адгезии к базальной мембране.

ДЕПОЛИМЕРИЗАЦИЯ АКТИНОВЫХ ФИЛАМЕНТОВ ИЗМЕНЯЕТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ФИБРОБЛАСТОВ 3T3-SV40 К ЛИТИЧЕСКОМУ ДЕЙСТВИЮ ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРНЫХ КЛЕТОК. © *И. А. Гамалей, Н. А. Филатова, К. М. Кирпичникова.* Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, igamaley@cytspb.rssi.ru.

Ранее мы обнаружили, что действие антиоксиданта N-ацетилцистеина (НАС) на трансформированные мы-

шинные фибробласты 3T3-SV40 приводит к изменениям актинового цитоскелета и временной потере ими чувствительности к литическому действию естественных киллерных клеток (ЕК — спленоцитов мышей). Эта потеря, свидетельствующая об изменении на поверхности клеток 3T3-SV40 детерминант узнавания для ЕК, коррелировала с появлением в клетках актиновых структур, подобных стресс-фибриллам, имеющимся в нормальных клетках 3T3, но не характерных для контрольных клеток 3T3-SV40 (Гамалей и др., 2006; Gamaley et al., 2006). В данной работе мы попытались частично смоделировать дезорганизующее актиновый цитоскелет действие НАС, чтобы выяснить, есть ли прямая связь между состоянием актинового цитоскелета и чувствительностью клеток к литическому действию ЕК. Для этого использовали естественный деполимеризатор актина латрункулин В (ЛВ). Для визуализации актиновых элементов цитоскелета служил фаллоидин-TRITC, естественную киллерную активность спленоцитов оценивали с помощью ³H-уридинового цитотоксического теста. Показано, что в присутствии ЛВ актиновый цитоскелет в клетках дезорганизуется в течение 2 ч. Степень этой дезорганизации и параллельного разрушения монослоя клеток зависят от концентрации ЛВ (200 нМ—1 мкМ) и максимальны при концентрации агента 1 мкМ. После удаления ЛВ разобраный актиновый цитоскелет собирается вновь (в течение 8—24 ч). Однако восстановленные после действия ЛВ структуры актинового цитоскелета в клетках отличаются от исходных и напоминают стресс-фибриллы нормальных клеток 3T3. Аналогичная картина (появление псевдофиламентов) наблюдалась нами и после действия НАС на эти же клетки. В присутствии ЛВ на фоне деполимеризованных структур актина чувствительность клеток 3T3-SV40 к действию ЕК постепенно уменьшалась до полной ее потери (при концентрации ЛВ 1 мкМ), чего не наблюдалось в присутствии НАС, который, разрушая актиновый цитоскелет, не изменял чувствительность клеток к действию ЕК. После удаления ЛВ из среды культивирования клеток, несмотря на появление в это время ярко выраженных актиновых «псевдофиламентов», чувствительность клеток к действию ЕК постепенно (в течение не менее 48 ч) возвращалась к исходному уровню. А потеря чувствительности клеток к ЕК в результате действия НАС как раз совпадала во времени с появлением в клетках актиновых «псевдофиламентов». Таким образом, можно заключить, что изменения в организации актинового цитоскелета при действии НАС не являются следствием прямой его деполимеризации и не определяют потерю (а лишь сопутствуют ей) чувствительности клеток к действию ЕК. Какое-либо действие на клетки ЛВ, помимо деполимеризующего актин, неизвестно, поэтому результаты дают основание предполагать наличие зависимости детерминант узнавания ЕК на мембране клеток 3T3-SV40 от полимеризации актина.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-48586).

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ КАРДИОМИОЦИТАРНОГО ТЕРМОСТАБИЛЬНОГО КОМПЛЕКСА В РОСТЕ СЕРДЦА В ПОСТНАТАЛЬНОМ РАЗВИТИИ. © *Н. М. Гиоргобиани, Л. П. Русивили, Г. Д. Туманишвили.* Факультет точных и естественных наук и Институт биологии Тбилис-

ского государственного университета, Республика Грузия, namugi@mail.ru.

О длительности действия ингибиторов в литературе представлены разноречивые результаты. Одни авторы указывают на 1.5-часовое торможение клеток асцитной опухоли. Действие гранулоцитарных ингибиторов также непродолжительно — 3—5 ч. По сведениям других авторов, продолжительность действия подобных ингибиторов затухает к 14 ч. Есть также данные о том, что эпидермальный ингибитор останавливает пролиферацию на 4—8 ч, однако при его двукратном введении с интервалом в 12 ч синтез ДНК в эпидермоцитах может быть подавлен в течение 2 сут. Вместе с тем подобная обработка полностью предотвращает индуцированную гиперплазию эпидермиса. При действии ингибитора фазы G₂ эмбриональные клетки прекращают деление примерно на 12 ч, а клетки кишечного эпителия — более чем на 12 ч. Внесение митогена в культуральную среду размножающихся гранулоцитов в течение 2 ч вызывает понижение их количества до 58 % к концу 2-х сут. Исходя из полученных ранее результатов о наличии ТСБК в ряде органов и его идентичных свойствах, проявляющихся в ингибировании синтеза РНК и пролиферативной активности в гомологичных растущих органах, возникло предположение о его роли в росте органа в постнатальном развитии. В настоящей работе изложены результаты многократных воздействий ТСБК из сердца половозрелых крыс на сердца крысят в возрасте от 2 до 25 сут. Определяли массу сердец, митотический индекс кардиомиоцитов и анализировали гистологические препараты. Проведенные исследования показали, что при ежедневном введении ТСБК в течение указанного времени масса сердца в конце эксперимента (25-е сут) в контрольной группе равна 139.2 ± 4.6 мг, а в опыте — 123.00 ± 1.39 мг. При этом МИ кардиомиоцитов в контроле и опыте не различался. На гистологических препаратах сердца крыс обеих групп не обнаружено каких-либо патологических изменений; в частности, мышечные волокна миокарда расположены нормально, контур кровеносных сосудов гладкий, ядра округлые, с нормальным расположением хроматина. Прослеживается нормальная исчерченность миофибрилл. Установлено, что многократное ежедневное введение ТСБК понижает темп роста сердца к 25-м сут развития. Однако ежедневное добавление ингибитора на этом сроке роста сердца не тормозит деления кардиомиоцитов. Из литературных источников известно, что меченый ингибитор лучше связывается с пролиферирующими клетками, чем с дифференцированными, в которых по мере их дифференцировки происходит постепенное накопление «своего» фактора, им насыщаются рецепторы, ответственные за рецепцию данного фактора. Одинаковое и незначительное количество митозов кардиомиоцитов у 25-суточных животных контрольной и экспериментальной групп (0.4 %) и при этом отставание в массе сердца у экспериментальных животных может свидетельствовать об ингибировании гипертрофии кардиомиоцитов при многократном введении ТСБК. Известно, что гипертрофия кардиомиоцитов вызвана усиленным синтезом РНК, белков и ДНК. Вместе с тем гипертрофия является следствием активации соответствующих генов в ответ на действие ростовых факторов. Ранее нами показано, что ТСБК является фактором, также ингибирующим синтез суммарной РНК кардиомиоцитов. Следовательно, не исключено, что многократное

введение крысам ТСБК задерживает гипертрофию кардиомиоцитов, результатом чего и является уменьшение массы сердца экспериментальных животных при одинаковой пролиферативной активности кардиомиоцитов у крыс обеих групп, характерной для сердца животных этого возраста.

ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ И БЛОКАТОРОВ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ НА ВНУТРИКЛЕТОЧНУЮ КОНЦЕНТРАЦИЮ КАЛЬЦИЯ У КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫСЫ В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАННОГО ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА. © Т. А. Голованова,¹ И. В. Дарашина,¹ Р. С. Хрусталева,² Г. Б. Белостоцкая.¹ ¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии РАН, k@iephb.ru, и ² ФЦСКЭ МЗ РФ, Санкт-Петербург.

В условиях ишемии и последующей реперфузии миокарда создаются условия для формирования окислительного стресса, который характеризуется неконтролируемой генерацией активированных кислородных метаболитов (АКМ), повреждающих клеточные структуры. В зависимости от степени выраженности окислительного стресса и устойчивости клеток миокарда к повреждающему действию АКМ имеют место обратимые (нарушение функции) или необратимые (гибель) изменения, которые приводят к накоплению внутриклеточного Ca²⁺, вызывая длительное ослабление сократительной способности миокарда. Увеличение содержания Ca²⁺ в цитоплазме кардиомиоцитов может быть опосредовано как активацией потенциалзависимых Ca²⁺-каналов, так и открытием рецепторуправляемых Ca²⁺-каналов сарколеммы и мембран саркоплазматического ретикулума (Huang, 1999). Предполагается, что дифференцированная упреждающая коррекция интенсивности свободнорадикальных процессов и стабилизация функционирования транспортных систем для ионов кальция позволяют уменьшить выраженность ишемических и реперфузионных повреждений миокарда и тем самым снизить частоту послеоперационных осложнений. Гистохром, созданный ТИБХ ДВО РАН в 1991 г., может блокировать цепные реакции перекисного окисления липидов в клетках, перехватывая свободные радикалы, хелатируя металлы-катализаторы пероксидации и ингибируя ферменты липоксигеназы, от активности которых во многом зависит окислительный статус клетки. Другим подходом для защиты клеток миокарда от избыточной концентрации Ca²⁺ служит использование блокаторов-каналов L-типа. Верапамил и его аналог изоптин неселективно блокируют рецепторы каналов L-типа у кардиомиоцитов и гладкомышечных клеток кровеносных сосудов. Известные сведения о повышении внутриклеточной концентрации свободного кальция ([Ca²⁺]_i) под влиянием свободнорадикальных процессов (Прокопенко, Герасимович, 2004; Долгих, 2005) положены в основу создания модели окислительного стресса при действии перекиси водорода на кардиомиоциты крыс *in vitro*. С помощью компьютерной системы для изучения внутриклеточной концентрации ионов (Intracellular Imaging & Photometry System, США) и флуоресцентного красителя Fura-2AM (10 мкМ) проведена оценка эффективности влияния гистохрома и изоптина на нормализацию [Ca²⁺]_i. Нами показано, что при действии H₂O₂ ($3 \cdot 10^{-4}$ М) в течение 10 мин происходит увеличение [Ca²⁺]_i в 1.72 ± 0.19 раза. Использование гистохрома (2 %) в разведении 1 : 10⁴ позволяет снизить на-

копление Ca^{2+} в цитозоле. Предварительная инкубация клеток с гистохромом в течение 10 мин снижает вызванное перекисью нарастание $[\text{Ca}^{2+}]_i$ до 1.30 ± 0.01 раза, в течение 30 мин—1 ч 45 мин — до 1.21 ± 0.04 , в течение 2—3 ч — до 1.33 ± 0.07 раза. Наилучший эффект дает одновременное действие гистохрома и перекиси — 1.14 ± 0.08 раза. Однако присутствие гистохрома при более длительном воздействии H_2O_2 даже при снижении ее концентрации до $3 \cdot 10^{-9}$ М не позволяет сдержать нарастание $[\text{Ca}^{2+}]_i$ после 40 мин совместной инкубации. В отличие от гистохрома изоптин в концентрации $2.5 \cdot 10^{-4}$ мг/мл оказывает защитное действие только при предварительной обработке: инкубация в течение 10 мин снижает увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ до 1.13 ± 0.16 раза, в течение 1 ч — до 1.05 ± 0.01 и в течение 2.5 ч — до 1.09 ± 0.02 раза. Полученные результаты позволяют предположить, что комплексное применение препаратов с антиоксидантными свойствами блокаторов Ca^{2+} -каналов L-типа в условиях окислительного стресса дают возможность снизить накопление внутриклеточного Ca^{2+} и тем самым уменьшить выраженность ишемических и реперфузионных повреждений миокарда.

Работа проводится по программе фундаментальных исследований президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине».

МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭМБРИОИДНЫХ ТЕЛ: КАК СОЗДАТЬ «ИСКУССТВЕННЫЙ» ЭМБРИОН ИЗ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК. © *О. Ф. Гордеева, Е. Б. Цитрин, Н. Ю. Красникова.* Институт биологии развития РАН, Москва, olgagordeeva@yandex.ru.

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) представляют собой уникальную экспериментальную модель для изучения фундаментальных механизмов, вовлеченных в регуляцию процессов раннего развития млекопитающих. При получении постоянных линий ЭСК разрушается позиционная информация доимплантационного эмбриона и устанавливаются новые пространственно-временные закономерности для дифференцировки плюрипотентных клеток. Рекапитуляция событий раннего эмбриогенеза на начальных стадиях дифференцировки ЭСК демонстрирует консервативность сигнальных путей, регулирующих эти процессы. Однако пространственное расположение различных типов клеток в эмбрионидных телах, формируемых ЭСК, не является идентичным по отношению к соответствующим ранним стадиям развития. В связи с этим программа дифференцировки в специализированные типы клеток реализуется в эмбрионидных телах на основе других закономерностей. В докладе будут обсуждены результаты исследования механизмов формирования эмбрионидных тел, образуемых ЭСК, эмбриональными герминативными и тератокарциномными клетками в контексте сравнения с ранними эмбрионами. Результаты наших исследований механизмов регуляции самых ранних этапов детерминации клеток-предшественников трех зародышевых листков и линии половых клеток из эмбриональных стволовых клеток показали, что определение клеточной судьбы происходит вследствие изменения баланса факторов сигнальных путей *Nodal:Activin:Lefty:BMP:TGFβ*. С другой стороны, воспроизведение ранних стадий развития в эмбрионидных телах значительно ограничено временем культивирования по-

следних в суспензионных культурах и позволяет адекватно моделировать ранний эмбрион в течение нескольких суток культивирования *in vitro*. Исследование закономерностей «искусственного эмбриогенеза» ЭСК *in vitro* позволяет создать оригинальную тест-систему для изучения эмбриотоксичности новых лекарственных препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 05-04-49185 и 06-04-08279-офи) и президиума РАН по программе фундаментальных исследований «Молекулярная и клеточная биология».

ИЗМЕНЕНИЯ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ КЛЕТОК MDCK В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ВАЗОПРЕССИНА. © *А. Н. Горшков, Е. С. Снугиревская, Я. Ю. Комиссарчик.* Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Известно, что клетки MDCK имеют на своей мембране V2-рецепторы к аргинин-вазопрессину (АВП). Связывание данных рецепторов с АВП запускает аденилат-циклазный путь внутриклеточного сигналинга, конечными звеньями которого являются активация протеинкиназы А и фосфорилирование ряда белков, в том числе аквапорина 2 по серину 256. Результатом данных внутриклеточных процессов оказывается транслокация аквапорина 2 из пула везикул апикальной цитоплазмы в апикальную плазматическую мембрану. Монослой клеток MDCK является, таким образом, удобной культуральной моделью для изучения механизмов действия антидиуретического гормона в собирательных трубках почки млекопитающих. В настоящей работе мы охарактеризовали ряд изменений тонкой структуры клеток MDCK в условиях воздействия АВП методами электронной и флуоресцентной микроскопии. Электронно-микроскопический анализ выявил, что конгломератный монослой MDCK представлен полярными клетками с развитыми зонами межклеточных контактов — плотными, промежуточными и десмосомами. Апикальная поверхность клеток несет многочисленные микроворсинки, а базолатеральная — заходящие друг в друга пальцевидные отростки, интердигитации. В цитоплазме клеток значительно развиты элементы аппарата Гольджи. Стопки уплощенных цистерн аппарата Гольджи с многочисленными окаймленными везикулами на их периферии локализованы преимущественно в надъядерной зоне цитоплазмы. Актиновые микрофиламенты обнаруживаются в кортикальном слое под апикальной мембраной, в апикальных микроворсинках, в областях межклеточных контактов, а также в виде отдельных пучков в цитоплазме клеток. Визуализация актина родамин-фаллоидином согласуется с данными ультраструктурного анализа. В базальной цитоплазме присутствуют стресс-фибриллы, связанные с фокальными контактами. Плотная сеть актина ассоциирована с межклеточными контактами. Подстилающий апикальную мембрану цитоскелет представлен тонкими пучками актина в микроворсинках и слабо флуоресцирующей сетью субмембранных актиновых фибрилл. Инкубация клеток MDCK с АВП (10^{-6} М) в течение 20 мин вызывает ряд изменений в их тонкой организации. Наблюдаются расширение межклеточных щелей и расхождение базальных интердигитаций соседних клеток. Происходит выраженное набухание цистерн

аппарата Гольджи. Актиновый цитоскелет в значительной мере деполимеризуется. На ультратонких срезах хорошо прослеживается снижение плотности слоя апикального субмембранного актина. Пучки актиновых филаментов сохраняются только в микроворсинках и в области плотных и промежуточных межклеточных контактов. Мечение актина родамиин-фаллоидином подтверждает результаты электронной микроскопии. Флуоресценция актина в клетках после инкубации в АВП наблюдается в виде точечных кластеров в апикальных микроворсинках, а также в зонах межклеточных контактов — по границам клеток. Практически полностью деполимеризуется апикальный субмембранный актин. В большинстве клеток монослоя исчезают также стресс-фибриллы базальной цитоплазмы. Результаты нашей работы говорят об участии актинового цитоскелета в ответе клеток MDCK на воздействие АВП. АВП-индуцированная деполимеризация актина была ранее продемонстрирована нами и другими исследователями на других АВП-чувствительных эпителиях *in vivo* и *in vitro*. Набухание межклеточных щелей и цистерн аппарата Гольджи изучаемых клеток в условиях воздействия АВП является свидетельством появления водного потока через монослой клеток. В наших экспериментах изначально отсутствовал приложенный к монослою трансэпителиальный осмотический градиент. АВП-индуцированный поток воды в данных условиях объясняется, по-видимому, активацией АВП переноса ионов натрия через эпителий и появлением, таким образом, апикально-базального осмотического градиента.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-48281).

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ В МЕХАНИЗМАХ ФОРМИРОВАНИЯ ДОЛГОВРЕМЕННОЙ ПАМЯТИ. © Л. Н. Гринкевич,¹ О. А. Харченко,¹ П. Д. Лисачев.² ¹ Институт физиологии РАН, Санкт-Петербург, lng@infran.ru, и ² Конструкторско-технологический институт вычислительной техники СО РАН, Новосибирск.

Показано, что для формирования долговременной памяти необходим синтез мРНК и белков *de novo*. Важную роль в регуляции экспрессии генов играют транскрипционные факторы (ТФ), являющиеся мишенями внутриклеточных регуляторных каскадов, опосредующих действия стимулов различной модальности, вовлекаемых в обучение. Сложность исследований в этой области заключается в том, что нейрон обрабатывает одновременно множество сигналов, пришедших с разных входов и опосредуемых несколькими внутриклеточными сигнальными системами, которые при этом могут взаимодействовать друг с другом. В последнее время в связи с обучением интенсивно изучаются митогенактивируемые MAP-киназные каскады (ERK, P38 и JNK), для чего широко используются моллюски. Моллюски имеют относительно просто устроенную нервную систему с гигантскими легко идентифицируемыми нейронами и способны к формированию нескольких видов условных рефлексов. Ранее нами было показано, что при выработке условного рефлекса пищевой аверзии у моллюска *Helix* происходит каскадная активация ТФ, регулирующих экспрессию генов через элементы CRE, SRE и AP-1. Эта

активация моделируется инкубацией ЦНС с серотонином и Ca^{2+} . У неспособных к выработке оборонительных форм пластичности ювенильных *Helix* в составе ТФ, связывающихся с регуляторным элементом SRE, и нижележащих ТФ семейства AP-1 наблюдаются существенные различия. Так как в SRE-зависимой экспрессии генов важную роль играют MAP-киназные регуляторные каскады, нами проведены исследования роли этих киназ в формировании условного оборонительного рефлекса пищевой аверзии. Показано, что на ранних стадиях обучения в парентально-висцеральном и церебральном комплексах ганглиев, связанных с оборонительным и пищевым поведением, происходит активация MAP-киназ ERK. При этом введение нейротоксина диокситриптамина (5,7-ДОТ), вызывающего дисфункцию серотонинергических терминалей и редуцирующего способность к данной форме обучения, снижает активацию MAP/ERK-киназ. Анализ отдельных идентифицированных нейронов ЦНС при обучении показал, что активация MAP/ERK неравномерна. Наиболее значительная активация MAP/ERK происходит в нейронах процеребрума (центральные нейроны, связанные с обработкой запаха) и командных нейронах оборонительного поведения. Инкубация ганглия с серотонином моделирует данный эффект. Кроме того, в ЦНС ювенильных животных с незрелыми механизмами формирования условных оборонительных рефлексов во все временные интервалы после обучения уровень активации ERK-киназ чрезвычайно низок. В отличие от взрослых животных не происходит и активация MAP/ERK-киназного каскада и на ранних стадиях обучения. Предполагается, что в основе неспособности моллюсков к пластичности оборонительного поведения лежит незрелость серотонинергической системы нейронов. Однако дискутируется вопрос о том, с каким звеном это связано — с пресинаптическим или с постсинаптическим. Наши данные по инкубации ЦНС ювенильных животных с серотонином свидетельствуют в пользу незрелости постсинаптического звена. Инкубация с серотонином ЦНС ювенильных животных не вызывает активации MAP/ERK, не меняет состава ТФ, регулирующих экспрессию генов через элементы SRE и AP-1, не вызывает появления кислого мозгоспецифического белка Rf 0.586, являющегося маркером обучения. Кроме того, нами получены предварительные данные о том, что у ювенильных улиток в отличие от взрослых практически отсутствует дегликолизированная форма серотониновых рецепторов 5HT1A. Незрелость определенных типов серотониновых рецепторов, прямо или опосредованно связанных с MAP/ERK-киназным каскадом, может быть одной из причин низкого уровня его активации. Таким образом, MAP/ERK-киназный каскад играет важную роль в формировании условных оборонительных рефлексов. Низкий уровень активации MAP/ERK-киназ в ЦНС через нарушение SRE-зависимой экспрессии генов может определять неспособность животных к выработке долговременных форм пластичности оборонительного поведения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 02-04-49731).

СТРУКТУРА КАРИОТИПА ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ ЛИНИИ E-14-IV. © Т. М. Гринчук, Л. Л. Алексеенко, К. М. Иванцов, И. А. Габай. Ин-

ститут цитологии РАН, Санкт-Петербург, gmdmk@mail.cytspb.rssi.ru.

При работе с клеточными культурами важно быть уверенным в правомочности сравнения данных, полученных на одной и той же линии, но в разных лабораториях. С этих позиций проблема стандартизации исключительно важна, особенно в исследованных эмбриональных стволовых клетках (ЭСК). Линия ЭСК мыши E-14-IV была получена около 20 лет назад, однако и по сей день широко используется в разных лабораториях в связи с изучением механизмов поддержания эмбрионального статуса клеток и их переходом в дифференцированное состояние. Одной из необходимых характеристик любых линий ЭСК являются данные о структуре кариотипа. Тем не менее во многих работах, выполненных на ЭСК мыши, данных о структуре кариотипа не приводится. В настоящей работе был проведен кариологический анализ линии E-14-IV из банка клеточных культур Института цитологии РАН. Клетки культивировали на фидере, в качестве которого использовали клетки мыши линии STO, обработанные митомизином С. Для кариологического анализа использовали клеточную культуру ЭСК клеток через 1 сут после пересева. Для накопления митотических клеток на стадии субмонослоя в культуральную среду добавляли 0.0004%-ный раствор колхицина. Препараты метафазных хромосом получали с использованием в качестве гипотонического раствора 0.75 М раствор КС1. Хромосомы окрашивали дифференциально на G-диски. Детально проанализировано 20 метафазных пластинок. Известно, что кариотип мыши в норме стабилен и представлен 19 парами аутосом и 2 половыми хромосомами ($2n = 40$), однако при переводе в условия *in vitro* очень быстро (в течение нескольких первых пассажей) претерпевает иммортализацию и становится на путь трансформации. Как быстро возникают изменения в структуре кариотипа стволовых клеток мыши в связи с культивированием в условиях *in vitro* и существуют ли принципиальные различия в характере и направленности процесса дестабилизации в сравнении с соматическими клетками мыши, претерпевающими процесс иммортализации и трансформации *in vitro*, далеко не ясно. Кариотипирование ЭСК E-14-IV, проведенное в настоящей работе, выявило генетическую неоднородность проанализированного материала. Ни одна клетка не имела типичного для мыши в норме набора хромосом. Их число было псевдо- или околодиплоидным и варьировало от 37 до 41. При детальном анализе кариотип оказался анеуплоидным и характеризовался утратой тех или иных хромосом набора или наличием лишних копий. Набор хромосом в пределах кариотипа от клетки к клетке варьировал. Трисомия была выявлена в большей части хромосом кариотипического набора, а именно в хромосомах 1, 2, 3, 4, 6, 9, 10, 13, 14, 16 и 17. Неслучайные изменения (присутствие трисомии в двух и более клетках) были отмечены только в четырех хромосомах — 4, 6, 12 и 13. Не исключено, что спектр хромосом-трисомиков при анализе большего числа метафазных пластинок может быть расширен. Половые хромосомы полностью или частично были утрачены. Линия характеризовалась также наличием в большинстве проанализированных клеток дополнительного генетического материала в виде сверхмелких микрохромосом, число которых от клетки к клетке варьировало (одна и более) и повышенной частотой неспецифических межхромосомных сцеплений (эктопическая

конъюгация). Наряду с хромосомами стандартной структуры в некоторых клетках выявлялись атипичные, случайным образом перестроенные хромосомы, создающие пул генетической изменчивости на популяционном уровне. Данные об анеупloidии линии E-14-IV совпадают с результатами тех немногочисленных работ на ЭСК мыши, в которых выявлены изменения кариотипа. Таким образом, можно сделать вывод о том, что протяженное во времени культивирование ЭСК мыши вызывает дестабилизацию кариотипа адаптивного характера, что неминуемо приводит к их высокой кариотипической (генетической) гетерогенности на популяционном уровне. По нашему мнению, такого типа кариотипическая изменчивость свойственна трансформированным клеткам мыши.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ *in silico* МЕЙОЗ-СПЕЦИФИЧНЫХ КОГЕЗИНОВ Rec8 И ИХ СОМАТИЧЕСКИХ ОРТОЛОГОВ Rad21 У ТАКСОНОМИЧЕСКИ ДАЛЕКИХ ОРГАНИЗМОВ. © Т. М. Гришаева, С. Я. Дадашев, Ю. Ф. Богданов. Институт общей генетики РАН, Москва, grishaeva@vigg.ru.

Проведено сравнение *in silico* двух групп хромосомных белков — митотических когезинов Rad21 и их мейотических ортологов Rec8 — у шести видов эукариот из разных таксономических групп: *Saccharomyces cerevisiae* (грибы), *Arabidopsis thaliana* (цветковые растения), *Caenorhabditis elegans* (круглые черви), *Danio rerio* (рыбы), *Mus musculus* и *Homo sapiens* (млекопитающие). Эти белки аннотированы в базах данных либо как митотические или мейотические когезины, либо как подобные им белки. Ранее было показано, что эти белки содержат специфический функциональный домен Rad21/Rec8, определяющий их сходство. Нами установлено, что Rad21 и Rec8 в пределах одного протеома различаются больше, чем белки одной группы (Rad21 или Rec8) у разных организмов. Различия в структуре митотического и мейотического когезинов наблюдаются не только за пределами функционального домена, но и внутри него. Все изученные белки Rad21 имели сходный набор консервативных мотивов внутри домена, тогда как мейотические когезины оказались более гетерогенными. У них порядок расположения мотивов иногда был нарушен; кроме того, выявлены мотивы, отличные от митотических. Нами также установлено, что вторичная структура всех изученных когезинов (способность формировать альфа-спиральную конфигурацию) видоспецифична. При этом в пределах одного вида Rad21 и Rec8 могут быть либо сходными по вторичной структуре, либо различными. Функции когезинов в митозе и мейозе неодинаковы. Различие сайтов связывания и белков-партнеров у митотических и мейотических когезинов обусловило заметные структурные различия Rad21 и Rec8, несмотря на наличие одного и того же функционального домена. Таким образом, нами впервые установлено, что ортологичные белки когезии сестринских хроматид в мейозе (Rec8) и митозе (Rad21) в пределах одного протеома имеют больше различий в отношении комбинаторики консервативных мотивов их первичной структуры, чем каждый из этих белков у организмов из разных таксонов (сумчатых грибов, нематод, рыб, млекопитающих и растений). Следовательно, мейотические белки, объединяемые общим названием Rec8, эволюционно менее консервативны, чем их соматические ортологи — белки

Rad21, — и существенно отличаются от них по комбинаторике консервативных мотивов первичной структуры.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-49052).

ВЛИЯНИЕ МАЛОЙ ГТФазы Ran НА ФОРМИРОВАНИЕ ЯДЕРНОЙ ОБОЛОЧКИ И ЯДЕРНЫХ ПОР. © Н. В. Губанова,¹ Е. А. Онищенко,² Е. В. Киселева.¹
¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, и ² Содерторнский университетский колледж, Стокгольм, Швеция, nat@bionet.nsc.ru.

В регуляции сборки ядерной оболочки в телофазе митоза принимает участие большое количество различных внутриядерных и цитоплазматических факторов. Недавние исследования, проведенные на уровне световой микроскопии, позволили предполагать, что малая ГТФаза Ran оказывает влияние на процесс сборки ядерной оболочки и ядерных пор (Ryan et al. *J. Cell Biol.*, 2003, **160**: 1041—1053). Известно, что неактивная форма Ran (Ran-ГДФ) транспортируется в ядро, где переходит в активную форму (Ran-ГТФ) при участии белка RCC1, который локализуется на хроматине и необходим для его деконденсации в телофазе. Локализация Ran-ГТФ на хроматине обеспечивает направленный рост микротрубочек в экваториальную область деления ядра. В настоящей работе при помощи электронно-микроскопического анализа исследовали влияние малой ГТФазы на Ran на процесс сборки ядерной оболочки и ядерных пор в синцитиальных эмбрионах дрозофилы. При помощи микроинъекций мы вводили в эмбрионы дрозофилы мутантную форму Ran — RanT24N, которая, блокируя RCC1, нарушает формирование Ran-ГТФ и как следствие — рост микротрубочек. Установлено, что в результате этого воздействия деления ядер не происходит. При инактивации митотических киназ в результате инъекции в эмбрионы циклогексимида (Onischenko et al. *Mol. Biol. Cell*, 2005, **16**: 5152—5162) в цитоплазме эмбрионов наблюдались ядра с конденсированным хроматином (что, вероятно, вызвано инактивацией RCC1), а также ядерная оболочка с множеством разрывов, не содержащая ядерных пор. Поскольку известно, что ядерная оболочка может собираться и после деполимеризации микротрубочек в метафазе (Su et al. *Genes Develop.*, 1998, **12**: 1495—1503), можно предположить, что для формирования интактной ядерной оболочки необходимы нормальные ядерные поры, сборка которых в нашем исследовании была нарушена в результате инъекции мутантной формы Ran. В результате последовательных микроинъекций в синцитиальные эмбрионы RCC1, вызывающего повышение концентрации Ran-ГТФ в эмбрионе, и циклогексимида в цитоплазме эмбриона наблюдается формирование необыкновенно длинных микротрубочек, расположенных радиально. При этом хроматин был диффузно распределен в цитозоле, а ядерная оболочка не собиралась. Таким образом, в результате проведенных исследований продемонстрировано, что компартиментализация активной и неактивной форм малой ГТФазы Ran в клетке играет ключевую роль в сборке ядерной оболочки и ядерных пор и необходима для направленного роста микротрубочек.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 07-04-00416-а) и в виде молодежного гранта им. акад. М. А. Лаврентьева СО РАН (грант № 106).

МЕХАНИЗМ ПОДАВЛЕНИЯ ОБРАЗОВАНИЯ НЕРАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВЫХ АГРЕГАТОВ С ПОМОЩЬЮ ШАПЕРОНА Hsp70 В МОДЕЛЯХ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ. © И. В. Гужова, А. В. Казначеева, М. В. Ипполитова, Т. В. Новоселова, А. В. Кинев, Б. А. Маргулис. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Нарушение нативной конформации белков и формирование нерастворимых белковых агрегатов являются причиной развития различных нейродегенеративных патологий, включающих в себя болезни Альцгеймера, Паркинсона и Гентингтона. С некоторыми из этих патологий можно успешно бороться в моделях *in vitro* и *in vivo*, вызывая экспрессию шаперонов Hsp70 и Hdj1, 2. Для того чтобы подтвердить антиагрегатную активность Hsp70, мы использовали свойство этого белка — способность проникать внутрь живых клеток, имитирующих хорею Гентингтона. Причина болезни Гентингтона — мутация белка хантингина, приводящая к удлинению полиглутаминового повтора в N-терминальной части молекулы. Длина этого повтора коррелирует с ранним началом болезни и с тяжестью ее протекания. На первом этапе работы установлено, что инкубация клеток нейроblastомы человека SK-N-SH, трансфицированных плазмидой, содержащей 1-й экзон гена белка хантингина (кодирующий 103 аминокислотных остатка глутамина и зеленый флуоресцирующий белок), с очищенным препаратом Hsp70 существенно понижала количество апоптотных клеток. Защитный эффект был связан с тем, что присутствие шаперона в клетке приводило к подавлению процесса агрегации мутантных белков, и это подтверждается данными, показывающими снижение как числа, так и размеров агрегатов. Нерастворимые белковые агрегаты формируются под действием фермента транслугтаминазы (TG), который обеспечивает образование ковалентных связей между остатками глутаминов агрегирующего белка и лизинами других белков. На роль донора лизинов был предложен ключевой фермент гликолиза ГАФДГ (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа), на поверхности которого три остатка лизина участвуют в реакции, катализируемой TG (Ortu et al., 2002). Поскольку в нашей лаборатории было показано, что ГАФДГ связывается с Hsp70 (Кинев, Маргулис, неопубликованные данные), мы предположили, что защитная активность Hsp70 в модели болезни Гентингтона обусловлена тем, что шаперон, когда его количество в клетке велико, связывается с ГАФДГ и маскирует соответствующие лизиновые остатки. Используя ту же клеточную модель, мы обнаружили, что Hsp70 и ГАФДГ колокализуются с полиглутаминовыми агрегатами. Hsp70, по нашим данным, физически взаимодействует с ГАФДГ, и чем больше Hsp70 присутствует в клетке, тем меньше ГАФДГ обнаруживается в агрегатах. Препарат Hsp70, внесенный в культуру клеток, имитирующую патогенез, может предотвращать формирование агрегатов из полиглутаминовых цепей, что позволяет рассматривать шаперон как потенциальное лекарство для терапии нейродегенеративных протектоксических патологий. Механизм защитного

действия шаперона, по крайней мере частично, заключается в том, что Hsp70 захватывает молекулы ГАФДГ и отбирает их из пула молекул, рекрутируемых для формирования нерастворимых (ковалентно сшитых) белковых агрегатов в клетках мозга.

АНАЛИЗ ТРАНСПОРТНОЙ АКТИВНОСТИ ПЕПТИДНЫХ ЧАСТЕЙ ШАПЕРОНА Hsp70. © И. В. Гужова, Б. А. Маргулис, Е. С. Мартынова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Недавние успехи геномики и протеомики привели к открытию новых кандидатов в лекарственные средства, таких как олигонуклеотиды, плазмиды, пептиды и белки. Многие из таких молекул не способны самостоятельно проникать в живые клетки, поэтому важной задачей является разработка методов эффективной доставки таких специфических грузов. В настоящее время существует несколько способов доставки биомолекул в клетки — микроинъекция, электропорация, вирусные системы и липосомы, однако не все из этих методов активно применяются ввиду низкой эффективности и цитотоксичности многих из перечисленных агентов. Альтернативный метод доставки основан на использовании пептидов, способных к транслокации через клеточную мембрану. В настоящее время описан целый ряд проникающих пептидов, которые обладают способностью эффективно доставлять молекулы груза различных типов, например целые белки или плазмиды. В настоящее время целый ряд работ свидетельствует о способности шаперона Hsp70 проникать в клетки различных типов. Мы предположили существование в структуре белка Hsp70 последовательности аминокислот, которые играли бы ключевую роль в проникновении целого белка. Для исследования были выбраны последовательности из С-терминальной части молекулы Hsp70, KRNSTIPTK (415—423), которую назвали KRN-пептид, и KSTGKANKITITNDKGRLSK (493—512), получившая название KST-пептид (работа проведена в нашем институте А. М. Лебедевым). Биотинилированные производные соответствующих пептидов были синтезированы в ООО «Диафарм» (Санкт-Петербург). Цель данной работы — анализ транспорта и физиологической активности фрагментов белка Hsp70, а также проверка возможности доставки с их помощью молекул белков в клетки млекопитающих. На первом этапе работ был проведен анализ способности пептидов входить в клетки. Как показали данные флуоресцентной микроскопии, KST-пептид способен проникать как в клетки миелоидной лейкемии U937, так и в клетки нейробластомы SK-N-SH, в то время как KRN-пептид обладает этой способностью в гораздо меньшей степени. Анализируя динамику вхождения биотинилированных пептидов в клетки миелоидной лейкемии U937 с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, мы сделали вывод о том, что после 15 мин инкубации пептиды располагались на поверхности плазматической мембраны, а на временной точке 30 мин оба пептида начинали образовывать структуры «пэччи» и «кэпы». После 1 ч инкубации KST-пептид был диффузно распределен по цитоплазме клеток, а KRN-пептид в клетках практически не был заметен. Следует отметить, что данные, полученные с помощью микроскопии, были подтверждены в биохимических экспериментах, в которых исследовали экстракты клеток, инкубированных с

мечеными пептидами. Целью второй части исследования было определить эффект пептидов на рост и жизнеспособность клеток, выбранных для анализа. С помощью методов окраски живых и погибших клеток удалось установить, что оба пептида нетоксичны для клеток U937 и лишь незначительно тормозили их рост. На следующем этапе мы испытали способность пенетративов доставлять в клетку нековалентно сшитые молекулы «груза». Например, как было продемонстрировано с помощью флуоресцентной микроскопии, модифицированные биотином молекулы KST-пептида эффективно транспортировали молекулы авидина в клетки глиомы человека T98. Таким образом, KST-пептид и в меньшей степени KRN-пептид обладают способностью проникать в клетки млекопитающих и могут стать перспективными средствами доставки в клетки активных биомолекул, терапевтических белков, пептидов и, возможно, нуклеиновых кислот.

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ КАРТЫ ХРОСОМ-ЛАМПОВЫХ ЩЕТОК ПЕРЕПЕЛА. © А. А. Дакс, С. Е. Дерюшева, С. А. Галкина, Е. Р. Гагинская. Биологический научно-исследовательский институт С.-Петербургского государственного университета.

В растущих ооцитах у многих видов животных, в том числе и у птиц, хромосомы на диплотенной стадии профазы мейоза преобразуются в хромосомы типа ламповых щеток со специфичной хромомерно-петлевой организацией. Они представляют собой биваленты, в которых гомологичные хромосомы соединены в местах хиазм. Такие хромосомы сильно деконденсированы, а их длина в несколько десятков раз превышает длину метафазных хромосом. Это позволяет добиться гораздо более высокого уровня разрешения физического картирования, что используется, например, для исследования организации генома домашней курицы (Galkina et al., 2006; Krasiukova et al., 2006). В нашей работе мы построили цитологические карты хромосом-ламповых щеток японского перепела 1—5 и полового бивалента ZW. Японский перепел *Coturnix japonica* является ценным сельскохозяйственным видом, а в последнее время получает большое распространение и как лабораторный объект. При окрашивании макрохромосом типа ламповых щеток японского перепела AT- и GC-специфичными флуоресцентными красителями (ДАПИ и хромомицином АЗ соответственно) наблюдается, что, как и на ламповых щетках курицы, хромомеры различаются по цвету и степени окраски. Часть хромомеров имеет тусклую окраску и при окрашивании ДАПИ, и при окрашивании хромомицином; некоторые являются ДАПИ- или хромомицин-положительными. Чаще всего яркие сигналы от обоих красителей накладываются друг на друга, из чего можно сделать вывод о том, что ДНК в данном хромомере содержит приблизительно равное количество AT- и GC-пар. Что касается хромомерного рисунка, то здесь тоже наблюдается заметное сходство с соответствующими ламповыми щетками курицы, хотя есть некоторые различия. Помимо этого, макрохромосомы японского перепела не несут на себе таких маркерных петель, как TGL (non-transcribing terminal giant loops) и LL (lumpy loop).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-48252).

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ АНТИТЕЛ ДЛЯ АДРЕСНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ. © С. М. Деев. Институт биоорганической химии РАН, Москва.

Развитие молекулярной медицины диктует необходимость создания белков, способных к мультивалентному и(или) мультиспецифическому взаимодействию с одним и тем же или с разными рецепторами на поверхности клетки-мишени, что обеспечивает высокоселективную доставку к ним действующих агентов. Для решения этих задач требуется подход, который позволил бы не только соединять белковые домены линейным путем, как в случае «слитых» белков, но и создавать сложные надмолекулярные комплексы, составленные из нескольких полипептидных цепей. Учитывая неоднозначность химического соединения белков и трудности последующего разделения олигомеров, химическую модификацию нельзя считать оптимальным подходом к решению указанных задач. Идеальная олигомеризационная система должна основываться на исключительно прочном и точном взаимодействии компонентов, состоять из гетеродимерных блоков и быть совместимой с широким набором белков. Всем сформулированным требованиям отвечает гетеродимерный модуль, состоящий из двух небольших белков — рибонуклеазы барназы и ее природного ингибитора барстара. Эти белки образуют комплекс с K_d около 10^{-14} М, сравнимый по силе связывания только со стрептавидин-биотиновой системой (K_d около 10^{-15} М), но не требующий в отличие от последней химической модификации одного из белков. Нами предложен принципиально новый подход для создания мультивалентных мини-антител, в котором использовано исключительно сильное сродство барназы и барстара. На основе модуля барназа: барстар и противораковых анти-HER-2/neu-мини-антител сконструированы двух- и трехвалентные олигомерные комплексы. Важным преимуществом предложенного подхода по сравнению с известными ранее являются строгое соотношение 1 : 1 партнеров в комплексе, их высокая стабильность и растворимость. Ни одна из существующих методологий не позволяет надежно получать стабильные олигомерные комплексы со строгим соотношением компонентов. Предложенный подход был реализован на модели антител, нацеленных на HER-2/neu-антиген, который локализуется на поверхности опухолевых клеток при раке молочной железы, яичника, матки, предстательной железы, желудка, легких и относится к наиболее специфичным маркерам раковых опухолей. Чтобы создаваемые молекулы обладали совокупностью заранее заданных свойств, с помощью компьютерного моделирования был осуществлен их рациональный дизайн. Антигенсвязывающие части данного белка включают в себя переменные (V_L и V_H) домены противоракового анти-HER-2/neu-антитела, соединенные между собой пептидным линкером RATPSHNSHQPSAGGPTANSQ, и образуют собственно мини-антитело, или scFv. Рибонуклеаза, барназа или барстар в свою очередь присоединены к нацеливающим scFv-фрагментам через шарнирный пептид EFPKPSTPPGSSGGAP. Этот пептид является аналогом шарнирной области IgG3 мыши и имеет протяженность 2.5—2.7 нм. Его назначение — обеспечить вращательную и сегментную подвижность основных фрагментов (антительного и барназного или барстарного) и тем самым, с одной стороны, сохранить функциональность каждого из них, а с

другой — сделать возможным одновременное взаимодействие с несколькими рецепторами на поверхности опухолевой клетки. Создан «молекулярный конструктор», позволяющий получать мономерные, димерные и тримерные антитела. Детальный физико-химический анализ синтезированных de novo антител показал значительно лучшие антигенсвязывающие свойства димеров и тримеров по сравнению с мономерными аналогами. Этот молекулярный конструктор позволил также создать ряд рекомбинантных производных, в которых противораковые мини-антитела были соединены с визуализирующими (флуоресцентные белки, полупроводниковые флуоресцентные нанокристаллы — «квантовые точки», коллоидное золото) или цитотоксическими (экзотоксин А и рибонуклеаза) агентами. Изучение адресной доставки созданных соединений к опухолевым клеткам показало высокую избирательность их взаимодействия с клетками-мишенями.

ВЛИЯНИЕ ЭСТРАДИОЛА НА ОСВОБОЖДЕНИЕ Ca^{2+} ИЗ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ДЕПО ООЦИТОВ СВИНЕЙ, СТИМУЛИРОВАННОЕ СОВМЕСТНЫМ ДЕЙСТВИЕМ ПРОЛАКТИНА И ТЕОФИЛЛИНА. © В. Ю. Денисенко, Т. И. Кузьмина, Г. В. Мурза. Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных РАСХН, Санкт-Петербург—Пушкин, tkuzmina@rol.ru.

В работе рассматриваются возможные пути взаимодействия пролактина, эстрадиола и теофиллин в механизмах внутриклеточной сигнализации на модели ооцитов свиней. Целью работы явилось изучение влияния эстрадиола на взаимодействие между пролактином и теофиллином при освобождении Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов свиней. В экспериментах использовали яичники свиней в стадии фолликулярного роста, без видимой патологии. Ооциты выделяли из фолликулов диаметром 3—6 мм. Инкубацию ооцитов проводили в среде Дюльбекко без кальция. Концентрацию кальция во внутриклеточных депо ооцитов свиней измеряли с помощью флуоресцентного зонда хлортетрациклина. Интенсивность флуоресценции зонда измеряли на люминесцентном микроскопе, снабженном необходимыми светофильтрами. В наших исследованиях показано, что пролактин в концентрации 50 нг/мл и теофиллин в концентрации 10 мМ вызывали в ооцитах освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. При совместном действии пролактина и теофиллина дополнительного освобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо не отмечали. Внесение в среду инкубации с ооцитами ингибитор протеинкиназы С Ro 31-8220 (10 нг/мл) приводило к освобождению Ca^{2+} из внутриклеточных депо. После обработки ооцитов ингибитором протеинкиназы С добавление пролактина или теофиллина не стимулировало освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Совместное действие пролактина и теофиллина без активной протеинкиназы С также не приводило к освобождению Ca^{2+} из внутриклеточных депо. В присутствии эстрадиола в концентрации 1 мкг/мл в ооцитах отмечали уменьшение количества кальция, аккумулированного во внутриклеточных депо. В обработанных эстрадиолом ооцитах добавление пролактина или теофиллина не стимулировало освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Однако совместное действие пролактина и теофиллина в присутствии эстра-

диола вызывало в ооцитах освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Ингибирование протеинкиназы С приводило к освобождению Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Последующее добавление к этим ооцитам пролактина или теофиллина не вызывало дополнительного выхода Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Интересно отметить, что стимулированное совместным действием пролактина и теофиллина освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо требует присутствия активной протеинкиназы С, и в присутствии ингибитора протеинкиназы С стимулирующий эффект совместного действия этих двух веществ отсутствует. С помощью ингибитора Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргина ранее было показано, что пролактин и теофиллин освобождают Ca^{2+} из различных внутриклеточных депо: пролактин — из IP_3 -чувствительных, теофиллин — из рианодин-чувствительных (Денисенко, Кузьмина, 2007). Если при совместном действии пролактина и теофиллина каждый из реагентов освобождает Ca^{2+} из депо независимо друг от друга, то в присутствии тапсигаргина не должно происходить дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Однако в присутствии эстрадиола обработка ооцитов тапсигаргином не оказывала влияния на освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо, стимулированное совместным действием пролактина и теофиллина. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в присутствии эстрадиола при совместном действии пролактина и теофиллина происходит освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. В этот процесс вовлечены различные типы внутриклеточных депо при активном участии протеинкиназы С.

ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ БЕЛЫХ КРЫС В НОРМЕ И ПРИ ХОЛЕСТАЗЕ. © Д. В. Дзидзигури,¹ Е. Д. Бакурадзе,¹ И. Р. Модебадзе,¹ Г. З. Мегрелишвили,² М. Д. Рухадзе.¹ ¹ Тбилисский государственный университет, d_dzidziguri@yahoo.com, и ² Национальный центр экспериментальной и клинической хирургии, Тбилиси, Республика Грузия.

Хирургический метод лечения опухолей поджелудочной железы различной локализации в большинстве случаев подразумевает широкомасштабную резекцию органа. При этом для предотвращения тяжелой инвалидизации пациентов желательны сохранение секреторной и эндокринной функций поджелудочной железы и индуцирование репаративной регенерации ткани. Поджелудочная железа, согласно литературным данным, обладает низкой способностью регенерации по сравнению с другими паренхимными органами (например, печенью). Установлено, что в ответ на резекцию в оставшихся частях ткани железы отмечаются гипертрофия и пролиферация выстилающих проток клеток эпителия. Не исключается и участие стволовых клеток в данном процессе. Опухоли поджелудочной железы в большинстве случаев сопровождаются так называемым внепеченочным холестазом. Холестаз в свою очередь дополнительно осложняет протекание восстановительных процессов. Целью наших исследований являлось изучение особенностей репаративной регенерации поджелудочной железы белых крыс в норме и при холестазе. Показано, что на 6-й ч после резекции увеличивается транскрипционная активность клеток в оставшейся массе ткани органа. На 2-е сут после резекции возрастает также митотическая активность панкреоцитов. Митотический индекс достигает 9.4 % на 4-е сут после операции. Край-

не важно, что встречаются единичные митотические клетки в эндокринной части железы. Участие β -клеток островков Лангерганса в процессе восстановления массы органа, как известно, до сих пор является спорным вопросом. Иная картина выявляется после лигирования общего желчного протока. Без резекции органа в течение первых 12 ч после окклюзии интенсивность синтеза РНК в изолированных ядрах панкреаса не меняется. В то же время значительно увеличивается пролиферативная активность клеток. Колхициновый митотический индекс панкреоцитов составляет 6.9 % уже на 2-е сут после операции. Нами также были изучены особенности репаративного роста поджелудочной железы при холестазе. Показано, что одновременное лигирование общего желчного протока и резекция органа вызывает подавление синтеза РНК на раннем этапе восстановительного роста (первые 8 ч). Однако на более поздних сроках с целью восстановления функции органа в панкреоцитах наблюдаются стимуляция транскрипционной активности и всплеск митозов. По предварительным результатам, в ткани поджелудочной железы, как и в печени, преобладает процесс полиплоидизации. На основании полученных результатов можно предположить, что при холестазе восстановительный рост паренхиматозных органов протекает по общей схеме. Для понимания механизмов регуляции пролиферации немаловажными являются идентификация и характеристика эндогенных факторов и установление механизмов их действия. В предыдущих работах нами было показано, что белковые факторы клеток печени и почек белых крыс путем ингибирования экспрессии генов в G_1 -фазе подавляют митотическую активность гомотипических клеток 7-суточных белых крыс. Исследованиями *in vivo* также установлено, что белковый фактор обладает тканевой специфичностью, не проявляя видовой специфичности. Нами установлено наличие аналогичного фактора в клетках поджелудочной железы белых крыс. Для сравнительного анализа белкового фактора применяли метод жидкостной хроматографии гидрофобного взаимодействия. Изучено влияние данного фактора на пролиферативную активность клеток ткани поджелудочной железы.

РЕОРГАНИЗАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *Hox* В ХОДЕ НОРМАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ И РЕГЕНЕРАЦИИ ПОЛИХЕТЫ *Nereis virens* (Annelida). © К. С. Добрякова, А. М. Киселев, М. А. Кулакова, Т. Ф. Андреева. Биологический научно-исследовательский институт С.-Петербургского государственного университета, atf@TA1589.spb.edu.

Гены *Hox* (кластер генов) являются ключевыми морфогенетическими регуляторами билатеральных животных. Они кодируют транскрипционные факторы и вовлекаются в реализацию многочисленных генетических программ развития организма. Показана их экспрессия и у взрослых животных, в том числе у человека. Нарушения экспрессии *Hox*-генов приводят к разнообразным аномалиям, в том числе к гомиозисным трансформациям и злокачественному росту. Основная и, вероятно, ancestrальная функция *Hox*-генов, реализуемая у всех *bilateria*, связана с векториальной регионализацией тела животного вдоль переднезадней оси с созданием позиционной информации, в соответствии с которой и развиваются различные органы и структуры тела. Эта функ-

ция *Hox*-генов в полной мере реализуется в ходе личиночного развития полихеты *Nereis virens* (Lophotrochozoa). Ранее нами были клонированы все 11 генов *Nvi-Hox* (de Rosa et al., 1999; Андреева и др., 2001). Было показано (Kulakova et al., 2002, 2007), что все эти гены участвуют в определении плана организации личинки (ректохеты) и правила их функционирования сходны с таковыми для животных двух других эволюционных ветвей (Ecdysozoa и Deuterostomia). Однако большая часть тела взрослой полихеты создается в ходе постларвальной сегментации в результате деятельности субтерминальной зоны роста и стволовых клеток, ее составляющих. Вовлечены ли в этот процесс гены *Hox*? Мы представляем данные, полученные методом гибридизации на целых животных (WMISH), о динамике экспрессии ряда генов *Nvi-Hox* (*Nvi-Hox1*, *Nvi-Hox4*, *Nvi-Lox2*, *Nvi-Lox4* и *Nvi-Hox7*) как в ходе нормальной постларвальной сегментации, так и в течение регенерации постериальных частей тела. Нами показано, что в ходе постларвального развития *N. virens* гены *Hox* создают уникальные паттерны экспрессии, которые, как мы полагаем, используются для определения переднезадних позиционных значений каждого сегмента. Основные домены экспрессии связаны с развитием эктодермальных структур туловища и вентральной ЦНС. По мере увеличения числа сегментов происходит постоянное изменение паттернов экспрессии генов *Hox* в соответствии с увеличивающейся длиной тела животного. Полихета *N. virens* способна регенерировать терминальные структуры (пигидиальную зону и зону роста) при утрате заднего конца тела и восстановить постларвальную сегментацию. Клеточные источники постериорной регенерации, однако, до сих пор не определены, так же как не определены и молекулярные механизмы воссоздания позиционной информации при восстановлении нормальной морфологии тела регенерирующего животного. При ампутации задней части тела паттерны экспрессии генов *Hox* очень быстро реорганизуются в соответствии с новой длиной тела. Мы полагаем, что система кластера генов *Hox* у постларвальных полихет служит не для создания морфологического разнообразия сегментов (они все одинаковые), а для определения их положения вдоль основной оси тела. Эта функция, вероятно, используется полихетами как при нормальном развитии, так и при регенерации и бесполом размножении. Очевидно, что функционирование стволовых клеток зоны роста постларвальных сегментов и определение позиционных значений каждого сегмента происходят при участии всего комплекса генов *Hox*. В ходе этого процесса некоторые гены *Hox* (*Nvi-Hox2* и *Nvi-Hox3*) экспрессируются только в стволовых клетках зоны роста; другие гены этого кластера (*Nvi-Hox1*, *Nvi-Hox4*, *Nvi-Hox5* и *Nvi-Lox4*) экспрессируются в уже сформированных сегментах и не экспрессируются в самых молодых сегментах и в зоне роста. Наконец, есть третья группа генов *Hox* (*Nvi-Lox5*, *Nvi-Lox2*, *Nvi-Hox7* и *Nvi-Post2*), которые активно экспрессируются и в зоне роста, и в сегментах различной степени морфологической зрелости.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-49654).

ИЗУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ И ФУНКЦИИ ТУМОР-СУПРЕССОРА Merlin В СПЕРМАТОГЕ-

НЕЗЕ *Drosophila melanogaster*. © Н. В. Дорогова,¹ Л. С. Чанг,² Л. В. Омелянчук.¹ ¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, ome@bionet.nsc.ru, ² Центр по исследованию детского рака, Детский исследовательский институт, Детский госпиталь и Департамент педиатрии, Медицинский колледж Университета штата Огайо, Колумбус, Огайо, США.

Белок дрозофилы Merlin является функциональным гомологом одноименного белка человека, который кодируется геном *NF2*. Этот ген относят к тумор-супрессорам, его мутации приводят к образованию доброкачественной опухоли — нейрофиброматоза второго типа. Было показано, что у дрозофилы этот белок также выполняет функцию тумор-супрессора: потеря функции белка Merlin в результате мутации у дрозофилы приводит к усилению пролиферации и разрастанию тканей (LaJeunesse et al., 1998). Эффект мутаций затрагивает не только соматическую ткань, но также клетки зародышевого пути, в результате чего жизнеспособные особи обоего пола стерильны (Fehon et al., 1997; LaJeunesse et al., 1998). В данной работе изучали функцию тумор-супрессора Merlin в сперматогенезе у *Drosophila melanogaster*. Анализ сперматогенеза дает возможность выявлять клеточную функцию гена при сопоставлении мутантного и нормального фенотипов. С помощью антител к белку Merlin мы выявили его клеточную локализацию и ее изменение в процессе сперматогенеза. Показано, что перед предмейотическими митозами белок локализован кортикально. Позднее, на стадии предмейотического роста, наблюдается интенсивное окрашивание всей цитоплазмы (включая кортекс), которое имеет характерную ретикулярную морфологию. В мейозе антитела не связываются с кортикальной областью, но выявляется колокализация белка Merlin с англомератом митохондрий, формирующимся в процессе сперматогенеза. Ассоциация с митохондриями сохраняется до стадии зрелого спермия. На поздних стадиях сперматогенеза, когда уже сформированы головки спермиев, появляется еще один сайт связывания белка, который соответствует области расположения акросомных гранул. Для мутантного фенотипа *Mer³* характерны незначительные нарушения цитокинеза (1—3 клетки с неразделившейся цитоплазмой на цисту) и массовые дефекты поляризации цист. В последнем случае ядра, которые в норме должны синхронно двигаться к одному из полюсов цисты, либо расходятся биполярно двумя консолидированными группами, либо хаотично распределяются по длине цисты. Эти нарушения отражаются на ходе дальнейшей дифференцировки в зрелые спермии, вызывая мужскую стерильность. Локализация белка у мутантов близка к нормальной. Однако морфогенез митохондриального тельца на стадии поляризации цисты нарушен. Мы предполагаем, что мутация *Mer3* предотвращает взаимодействие белка Merlin с другими субклеточными структурами или белками, обеспечивающими нормальный морфогенез (рост и удлинение) митохондрий и, возможно, других внутриклеточных мембран.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 05-04-48316) и Министерством обороны США по программе исследования нейрофиброматозов (грант W1XWH04-1-0509).

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ЭПИГЕНОМНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ ПРОСПЕКТИВНОЙ ПОТЕНЦИИ КЛЕТОК В ДООИМПЛАНТАЦИОННЫХ МЫШИНЫХ ЗАРОДЫШАХ. © А. П. Дыбан. Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Andrei_dyban@inbox.ru.

Трансформация тотипотентной зиготы в полипотентные эктодермальные клетки примитивной эктодермы (эпибласта) регулируется генетическими и эпигеномными механизмами. В эпибласте возникает популяция клеток, способных трансформироваться *in vitro* в стволовые эмбриональные клетки. Важную роль играет взаимодействие факторов внешней среды с транскрипционными факторами, проявляющими активность сразу же после активации яйцеклетки. В докладе суммируются литературные данные, свидетельствующие о высокой чувствительности зиготы к колебаниям температуры, рН и эндогенных оксидантов. Обращается внимание на отдаленные последствия повреждения генетического аппарата зиготы, которые могут проявляться во время антенатального и постнатального онтогенеза и, в частности, приводить к возникновению определенных синдромов, передающихся последующим поколениям.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 04-04-48993-а и 07-04-01216-а).

К ВОПРОСУ О ПЛАСТИЧНОСТИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЕФИНИТИВНЫХ ТКАНЕЙ. © П. А. Дыбан. Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург.

В последние годы появилось большое количество публикаций, авторы которых делают выводы о пластичности, в частности о трансдифференцировке дефинитивных стволовых клеток определенных линий в другие клеточные типы. На конкретных примерах будет показано, что, как правило, эти выводы не подкреплены экспериментальными доказательствами, исключаящими другую интерпретацию полученных данных. Во-вторых, необходимое для исследований количество клеток получают, культивируя их в средах, содержащих иммуномодуляторы, концентрация которых значительно превышает контрольные показатели, в результате чего, по нашему мнению, образуются линии, принципиально отличающиеся по своим свойствам от исходных стволовых клеток, выделенных из дефинитивных тканей. Таким образом, в настоящее время нет никаких убедительных причин подвергать ревизии классическое представление о том, что все изменения тканей, в частности процессы метаплазии, осуществляются только в пределах их гистобластических потенций, в рамках, определяемых методом в гистогенетической классификации тканей.

ТЕСТИРОВАНИЕ НОВЫХ ДНК-СПЕЦИФИЧНЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ КРАСИТЕЛЕЙ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОГО ОКРАШИВАНИЯ ХРОМОСОМ ЧЕЛОВЕКА И РАСТЕНИЙ. © Е. А. Егорова, А. А. Иванов, К. В. Попов, А. Л. Жузе, А. В. Зеленин. Институт молекулярной биологии РАН, Москва, chrom@eimb.ru.

Интерес к флуорохромам, специфично связывающимся с определенными нуклеотидными последовательностями, в немалой степени обусловлен перспективностью их фармакологического использования. Лиганды, специфично связывающиеся с регуляторными последовательностями и моделирующие активность ферментов репликации и транскрипции, могли бы быть использованы в противоопухолевой и противовирусной терапии. В цитологии при окрашивании ДНК-специфичными флуоресцентными красителями митотических хромосом человека и животных выявляется рисунок дифференциальной исчерченности хромосом. Обычно в качестве такого ДНК-специфичного флуоресцентного красителя используется Хёхст 33258 (2'-(4-гидроксибензил)-5-(4-метил-1-пиперазинил)-2,5'-бис-1Н-бензимидазол) или DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол). Проведена проверка возможности использования в цитогенетических исследованиях новых флуорохромоов: димерных бисбензимидазолов и производных Хёхста 33258 (синтезированных в группе А. Л. Жузе нашего института). При создании исследованных соединений в качестве исходной структуры был выбран АТ-специфичный краситель Хёхст 33258. Синтез новых соединений был осуществлен для создания новых, высокоспецифичных лигандов, узнающих два сайта, состоящие из трех или четырех АТ-пар — (А/Т)_n-NN-(А/Т)_n, где *n* равно 3 или 4, и накручивающих при этом примерно один виток двойной спирали ДНК. Первичное тестирование 10 флуорохромоов проводили на препаратах фиксированных фибробластов эмбрионального легкого MRC-5. Было обнаружено, что четыре из десяти синтезированных флуоресцентных красителей специфично связываются с хроматином ядер фибробластов. При облучении ультрафиолетовым светом (380 нм) они излучают свет в голубой части спектра (420 нм), что позволяет использовать их с блоком фильтров, рассчитанных на наблюдение DAPI. При возбуждении светом с другой длиной волны (синим — 430 нм, зеленым — 488 нм) свечения не наблюдалось (ни в зеленом, ни в красном диапазонах соответственно). При окрашивании препаратов метафазных хромосом каждым отобранным соединением выявляется Q-подобный рисунок дифференциального окрашивания хромосом. По сравнению с окрашиванием совместно с DAPI тестируемые новые флуорохромоамы выявляли более четкий и контрастный рисунок расположения сегментов по длине хромосом. Окрашивание этими флуорохромоами красителями хромосом льна выявило рисунок окрашивания, подобный С-окраске, что очень характерно для растений. Для хромосом пшеницы и ячменя прямое окрашивание флуорохромами дифференциального окрашивания не выявило, так же как и при окрашивании DAPI и Хёхст 33258. Помимо этого, данные соединения обладают большей стабильностью и устойчивостью к выгоранию, чем DAPI.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 05-08-33607, 06-04-81007 и 07-04-00268).

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ГОЛОТУРИЙ. © М. Г. Елисейкина, Т. Ю. Магарламов. Институт биологии моря ДВО РАН, Владивосток, meliseikina@yandex.ru.

В соединительной ткани голотурий *Eupentacta fraudatrix* и *Apostichopus japonicus* обнаружены небольшие

свободноподвижные (ювенильные) клетки с высоким ядерно-плазменным отношением. Клетки обладают плотным гиперхромным ядром, вблизи которого располагается клеточный центр. Ядро окружено низкокодифференцированной цитоплазмой, содержащей лишь свободные рибосомы либо полисомы, единичные митохондрии и иногда — укороченные цистерны ШЭР. Изучаемые виды голотурий обладают способностью к эвисцерации комплекса внутренних органов и их последующему восстановлению. Экспериментально вызванная эвисцерация, сопровождающаяся потерей большей части целомиической жидкости с содержащимися в ней амебоцитами, стимулирует пролиферацию ювенильных клеток, их миграцию из состава соединительной ткани кожно-мускульного мешка в полость тела и дифференцировку в основные эффекторные клетки защитной системы голотурий — амебоциты и морулоподобные клетки. Установлено, что ювенильные клетки соединительной ткани голотурий служат для поддержания качественного и количественного составов популяции целомоцитов голотурий и могут рассматриваться как стволовые по отношению к основным типам клеток целомиической жидкости голотурий.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-01247-а).

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ ТИРОЗИНКИНАЗ И ТИРОЗИНФОСФАТАЗ НА ОРГАНИЗАЦИЮ МИКРОТРУБОЧЕК В КЛЕТКАХ КОРНЯ *Arabidopsis thaliana*.
© А. И. Емец,¹ Я. А. Шеремет,¹ Ж.-П. Вербелен,² Я. Б. Блюм.¹ ¹ Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, и ² Университет Антверпена, Бельгия.

Микротрубочки (МТ) являются высокодинамичными составляющими цитоскелета, принимающими участие во многих клеточных процессах, таких как митотическое деление, внутриклеточный транспорт, а также поддержание постоянной формы и полярности клеток. Главным компонентом МТ является гетеродимерный белок тубулин, который состоит из α - и β -субъединиц. Известно, что обе субъединицы тубулина, в том числе и растительного, могут подвергаться различным типам посттрансляционных модификаций, среди которых особое место занимает фосфорилирование. Нами впервые было показано, что как α -, так и β -тубулин высших растений подвергаются фосфорилированию по остаткам тирозина. Известно, что у высших растений фосфорилирование белков по остаткам тирозина принимает участие во многих важных клеточных процессах, таких как передача внутриклеточного сигнала, определение путей MAP-киназного каскада и контроль клеточного цикла. Исходя из этого основной интерес представляет определение функциональной роли данной посттрансляционной модификации и ее влияния на организацию и функционирование МТ. Известно, что уровень фосфорилирования белков определяется взаимосбалансированным функционированием протеинкиназ и протеинфосфатаз. Поэтому для изучения влияния процессов тирозинфосфорилирования на организацию МТ в различных типах клеток и тканей *Arabidopsis thaliana* нами было использовано несколько видов ингибиторов тирозинкиназ и ти-

розинфосфатаз. В качестве ингибитора тирозинфосфатаз использовали ортованадат натрия (100, 250 и 500 мкМ), а в качестве ингибиторов тирозинкиназ — ингибитор нерцепторной тирозинкиназы гербимицин А (10, 30 и 50 мкМ) и ингибиторы рецепторных тирозинкиназ тирфостин AG 18 (10, 30 и 50 мкМ) и генестеин (0.1, 1.0 и 10.0 мкМ). Влияние ингибиторов тирозинкиназ и тирозинфосфатаз на организацию МТ *in vivo* изучали на растениях *A. thaliana*, экспрессирующих химерный белок GFP-MBD (MBD-фрагмент последовательности белка MAP-4). 4-суточные проростки обрабатывали растворами ингибиторов и активаторов тирозинфосфорилирования в течение 3, 6, 12, 24 и 48 ч. GFP-меченные МТ в клетках *Arabidopsis* визуализировали *in vivo* с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 510 META (Carl Zeiss, Германия). В ходе экспериментов было установлено, что рост и развитие корневых волосков являются очень чувствительными к процессам тирозинфосфорилирования. Обработка корней *Arabidopsis* всеми тестируемыми ингибиторами тирозинкиназ в течение 24 ч приводила к значительным нарушениям морфологии проростков. Наиболее выраженные изменения наблюдались в развитии корневых волосков. Показано, что обработка проростков 30 мкМ гербимицином А вызвала полное ингибирование роста корневых волосков, а обработка 50 мкМ тирфостином AG18 — swelling корневых волосков и торможение их роста. После обработки 10 мкМ генестеином также наблюдались нарушения в образовании и росте корневых волосков. Было обнаружено, что ингибирование процесса тирозинфосфорилирования приводит к значительным нарушениям в организации МТ в клетках зоны дифференциации корня, а именно вызывает изменение их ориентации, а в некоторых случаях приводит к частичному или полному разрушению МТ. В то же время обработка проростков ингибитором тирозинфосфатазы ортованадатом натрия (250 мкМ) оказывала противонаправленное влияние на рост и морфологию корневых волосков, а также на организацию МТ. Активирование процесса тирозинфосфорилирования приводило к индукции роста и образования корневых волосков и вызывало изменение ориентации МТ в клетках коры и эпидермиса зон растяжения и дифференциации из поперечной на продольную. На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что процесс тирозинфосфорилирования белков принимает активное участие в регуляции организации МТ в растительных клетках и тканях различных типов.

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА ПОДДЕРЖИВАЮЩЕЙ МЕТИЛАЗЫ 5-АЗА-2-ДЕЗОКСИЦИТИДИНА НА АПОПТОЗ И ФУНКЦИИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ. © А. В. Еремеев, А. С. Замай, Н. В. Зотова. Центр репродуктивной медицины, Красноярск.

При переносе или слиянии ядер соматических клеток с эмбриональными стволовыми клетками возникает проблема наследования статуса метилирования ДНК. При этом наблюдается неполная реактивация экспрессии *oct-4*, приводящей к дисрегуляции экспрессии *oct-4*-зависимых генов. Неполное репрограммирование ключевых генов ведет к нарушениям плюрипотентности. Возможно, для повышения эффективности репрограммирования целесообразно перед переносом ядер «стирать»

эпигенетическую память. Мы предположили, что предварительная обработка соматических клеток, используемых для слияния с цитопластами, 5-аза-2-дезоксцитидином (5-аза-2-ДЦ) — ингибитором поддерживающей метилазы — может позволить получить линии клеток, аутологичных донорским. Однако 5-аза-2-ДЦ может вызывать хромосомные нарушения и приводить к апоптозу клеток. Поэтому на первом этапе целесообразно исследовать эффекты этого ингибитора на структуру хромосом, функциональное состояние и жизнеспособность клеток. Культуру фибробластов получали из 7—10-недельных медицинских фетусов, после 3-го пассажа переводили в среду с 5-аза-2-ДЦ (5 мкг/мл). Через 24, 48 и 72 ч в клетках определяли апоптоз, концентрацию кальция ($[Ca^{2+}]$), pH и содержание NAD(P)H. На 5-е сут проводили стандартное карiotипирование. Апоптоз определяли с помощью Хёста 33342 и иодида пропидия на микроскопе Olympus BX51. $[Ca^{2+}]$, pH и микровязкость мембран определяли с помощью зондов Fura-2AM (2.5 мкМ) и флуоресцеина изотиоцианата изомера I (1 мг/мл) и пирена (3 мкМ). NAD(P)H определяли по его собственной флуоресценции. Измерения проводили на спектрофлуориметре Aminco Bowman Series 2 (Thermo Spectronic). 5-аза-2-ДЦ вызывал апоптоз фибробластов в культуре: через 24 ч обнаружено 52 % апоптотических клеток, в то время как в контроле их было 16 %. В дальнейшем происходило уменьшение числа апоптотических клеток, через 48 ч их было 36 %, а через 72 ч — 8 %, при этом деление фибробластов возобновлялось. Внутриклеточный кальций — один из важнейших регуляторов клеточного роста, дифференцировки и апоптоза. В контрольных фибробластах величина $[Ca^{2+}]$ была 13 нМ на 100 клеток, через 24 ч инкубации с 5-аза-2-ДЦ она увеличилась до 67 нМ, возможно вследствие интенсификации апоптотических процессов. На 2-е сут величина $[Ca^{2+}]$ в клетках была сравнима с таковой в контроле. Через 24 ч 5-аза-2-ДЦ вызывал закисление в фибробластах, однако значение pH восстанавливалось до контрольной величины на 3-и сут. АФК в малых концентрациях модулируют клеточные функции, они образуются в клетках как побочные продукты общего метаболизма и деятельности NADPH-оксидазы. В течение 48 ч при действии 5-аза-2-ДЦ содержание NAD(P)H практически не менялось и было сравнимо со значением в контрольных фибробластах. Однако на 3-и сут содержание NAD(P)H резко уменьшалось, что говорит об увеличении количества АФК в фибробластах. При инкубации фибробластов с 5-аза-2-ДЦ микровязкость белок-липидных контактов была выше, чем в контроле, что могло приводить к ингибированию мембранных ферментов. Инкубация фибробластов с ингибитором в течение 24 и 48 ч приводила к сопровождающему пролиферацию уменьшению жесткости липидного бислоя мембран. Однако уже через 72 ч из-за увеличения уровня АФК и интенсификации перекисных процессов увеличивалась жесткость липидного бислоя мембран фибробластов. Карiotипирование показало, что культивирование фибробластов в среде с 5-аза-2-ДЦ не приводило к хромосомным изменениям. Таким образом, использование 5-аза-2-ДЦ приводит к обратимым изменениям физико-химических свойств клеток, к селективному отбору клеток в культуре, вызывая апоптоз. При дальнейшем культивировании число апоптотических клеток уменьшается, пролиферация возобновляется. По-видимому, с целью повышения эффективности репрограммирования целесообразно перед проце-

дурой переноса ядер использовать клетки на этапе восстановления их функций и пролиферативной активности.

РАННИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ХРОМАТИНА ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДЕЙСТВИИ ПОВРЕЖДАЮЩИХ ФАКТОРОВ. © А. В. Ермаков, М. С. Конькова, С. В. Костюк, Н. А. Егорова, Н. А. Ляпунова, Н. Н. Вейко. ГУ Медико-генетический научный центр РАМН, Москва.

Ранее нами было показано, что при действии на культивируемые клетки человека генотоксичных факторов в 1-е ч наблюдается «ранний ответ» на стресс, который выражается в активации синтеза общей РНК и рРНК клетки. Интенсивность «раннего ответа» отрицательно коррелировала с количеством клеток, которые в дальнейшем погибают по механизму апоптоза («поздний ответ»). Представляло интерес выяснить, сопровождаются ли наблюдаемые при «раннем ответе» изменения в уровне транскрипции генома структурными перестройками хроматина клеточного ядра. В качестве повреждающих факторов мы выбрали: 1) малые дозы радиации (3 и 10 сГр); 2) окислительный стресс, вызываемый перекисью водорода (в концентрациях 10 и 100 мкМ). Объектом исследования служили выделенные лимфоциты здоровых доноров, культивируемые 2 ч при 37 °С в среде, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. Для определения изменений в пространственной организации хроматина ядер при указанных воздействиях применили, во-первых, метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), позволяющий детектировать пространственное расположение прицентромерных участков гетерохроматина хромосомы 1 (район 12q12, ДНК-зонд — биотинилированный фрагмент, гомологичный субфракции сателлита III), и, во-вторых, метод специфичной окраски азотнокислым серебром активных в отношении синтеза рРНК структур ядрышка. Анализ пространственного расположения участков гетерохроматина хромосомы 1 проводили путем перевода двухмерного расположения сигналов в ядре в трехмерное с помощью специального алгоритма, разработанного в лаборатории. Получали гистограммы частотного распределения значений нормированного радиус-вектора (r) гибридизационного сигнала для интактных и подвергнутых воздействию ядер лимфоцитов. Для анализа числа и общей площади серебящихся центров в ядре использовали написанную для этой цели компьютерную программу. При действии малых доз радиации или перекиси водорода в концентрации 10 мкМ мы наблюдали одинаковые эффекты: 1) перемещение анализируемых прицентромерных участков гетерохроматина от мембраны к центру ядра в подавляющем числе ядер; 2) изменение структуры ядрышек — увеличение числа и общей площади серебящихся центров в ядре. Обнаруженные эффекты соответствуют изменениям, характерным для активированных или стимулированных к пролиферации G_0 -лимфоцитов. Высказано предположение о том, что одним из факторов, стимулирующих активацию лимфоцитов при повреждающем воздействии, могут являться фрагменты внеклеточной ДНК (внДНК) погибших клеток, которые повышено чувствительны к апоптозу. Мы установили, что дозы радиации 3 и 10 сГр индуцируют увеличение в лимфоцитах активности каспазы 3. Бо-

лее того, ингибирование активности этого фермента приводило к отсутствию наблюдаемых нами клеточных реакций на действие радиации. Увеличение активности каспазы 3 свидетельствует об интенсификации процессов спонтанного апоптоза лимфоцитов после облучения и возможной индукции апоптоза в новых клетках, повышено чувствительных к облучению. В отдельных экспериментах мы показали, что фрагменты вДНК, выделенные из среды культивирования облученных клеток, действуют на интактные лимфоциты и вызывают описанные выше структурно-функциональные изменения, которые указывают на активацию клеток. Мы предположили, что TLR9 («toll-like»-рецепторы)-опосредованный сигнальный путь может играть в этом существенную роль. Действительно, после блокады TLR9 ингибиторами (олигонуклеотидом или хлорокином) эффект перемещения прицентромерных локусов хромосом в лимфоцитах при действии радиации или вДНК, выделенной из среды облученных клеток, исчезает. На основании полученных нами результатов можно заключить, что ранний ответ лимфоцитов на повреждающие воздействия сопровождается выраженными структурными изменениями хроматина ядер. Эти изменения могут быть вызваны (наряду с другими причинами) воздействием фрагментов ДНК погибших клеток (вДНК).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-48101).

ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА ПРОТЕОГЛИКАНОВ, СИНТЕЗИРУЕМЫХ ТРАНСФОРМИРОВАННЫМИ МИОБЛАСТАМИ КРЫСЫ L6J1 В КУЛЬТУРЕ. © *И. И. Ермакова, Г. А. Сакута, А. Л. Мокрушин, Т. А. Черткова, В. И. Морозов.* Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ipnabiochem@mail.ru.

Регенерация мышечной ткани — это сложный многоэтапный процесс, ключевым моментом которого является активация стволовых клеток скелетных мышц, миобластов, запускающая их пролиферацию, миграцию и дифференцировку. Наряду с факторами роста большое значение в регуляции различных стадий миогенеза отдают компонентам внеклеточного матрикса — протеогликанам (ПГ). Цель работы — выделение и анализ ПГ культуры трансформированных миобластов крысы L6J1 для последующего изучения роли ПГ в процессах пролиферации и дифференцировки миобластов. Выделение ПГ проводили с помощью сорбента Q-сефароза из трех компонентов клеточной культуры миобластов L6J1 — культуральной среды, внеклеточного матрикса (ВКМ) и клеток. Элюция сорбированного материала в градиенте NaCl позволила отделить ПГ от основной массы белков, элюируемых при низкой концентрации соли. Получено по четыре фракции для каждой составляющей клеточной культуры, в том числе две фракции ПГ для ВКМ и культуральной среды и одна фракция — для миобластов. Показано, что ПГ культуральной среды практически полностью представлены ПГ эмбриональной бычьей сыворотки — неотъемлемого компонента среды для культивирования клеток. С помощью ферментов хондроитиназа ABC и гепариназа III, специфически расщепляющих хондроитин/дерматан сульфат и гепаран сульфат, выявлено преобладание хондроитин/дерматансуль-

фат ПГ во всех составляющих культуры миобластов. В процессе электрофореза в ПААГ материала, обработанного ферментами, охарактеризованы коровые белки ПГ, мол. массы которых составила 45 и 90 кДа в случае ПГ культуральной среды, 63 кДа в случае ВКМ и 55 кДа в случае миобластов. Таким образом, в результате настоящего исследования получены новые данные, характеризующие ПГ различных составляющих клеточной культуры трансформированных миобластов крысы L6J1, и выделены различные классы ПГ в количестве, достаточном для изучения влияния этих соединений на процессы пролиферации и дифференцировки миобластов.

Работа выполнена при финансовой поддержке С.-Петербургского научного центра РАН в 2005—2007 гг.

Ca²⁺-КАНАЛЫ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ТИМОЦИТОВ, АКТИВИРУЕМЫЕ КАЛЬМИДАЗОЛИЕМ. © *А. С. Ефремова, В. П. Зинченко.* Институт биофизики клетки РАН, Пущино, vprz@mail.ru.

Ca²⁺-связывающий белок кальмодулин (КМ) контролирует напрямую или через посредников активность многих Ca²⁺-транспортирующих систем в клетке. Наиболее специфичный ингибитор КМ кальмидазолий (R24571) реагирует с КМ, меняет его конформацию и вытесняет из комплекса с белком-мишенью. Ранее нами показано, что кальмидазолий в микромолярных концентрациях кратковременно активирует неспецифический Ca²⁺-канал в плазматической мембране клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ). С целью установления наличия аналогичных Ca²⁺-каналов в других типах клеток нами проведены исследования на тимоцитах крысы. С использованием флуоресцентного анализа клеточных суспензий в настоящей работе показано, что R24571 вызывает двухфазное повышение Ca²⁺ в цитозоле тимоцитов с выходом на плато. Повышение Ca²⁺ обусловлено активацией его входа снаружи и ингибированием Ca²⁺-АТРазы плазматической мембраны (PMCa²⁺). Первая, быстрая, фаза обусловлена активацией неспецифического (Mn²⁺- и Ni²⁺-проводящего) Ca²⁺-канала. Вторая, медленная, фаза связана с образованием и метаболизмом эндогенного ингибитора канала (предположительно арахидоновой кислоты). EC50-активации для обоих процессов примерно совпадают и равны 1—2 мкМ. Исследованы биофизические свойства и механизмы регуляции этого канала. Канал быстро активируется (время достижения максимальной активности канала 5—7 с), характеризуется высокой проводимостью и быстро инактивируется. Ca²⁺-канал проницаем для Mn²⁺ и Ni²⁺. Профили скоростей входа Ca²⁺ и Mn²⁺ совпадают, что указывает на отсутствие вклада других специфических к Ca²⁺ каналов в формирование Ca²⁺-сигнала. Активность канала слабо зависит от температуры. При понижении температуры максимальная скорость входа Ca²⁺ практически не меняется, но амплитуда быстрой фазы сигнала растет за счет увеличения времени инактивации канала. Скорость медленной фазы входа Ca²⁺ падает при уменьшении температуры, что указывает на ферментативный метаболизм ингибитора Ca²⁺-канала. Ингибитор фосфолипазы C U73122 в концентрации 2 мкМ и специфический ингибитор Ca²⁺-каналов, активируемых опустошением ретикулула, гадолиний в микромолярных концентрациях не подавляли Ca²⁺-сигнал, индуцированный R24571. Инги-

битор липоксигеназного окисления арахидоновой кислоты нордигидрогуаретиковая кислота в концентрации 3—5 мкМ полностью подавляла быструю фазу входа Ca^{2+} . Ингибитор Ca^{2+} -зависимой цитозольной фосфолипазы A2 (ФлA2) бромфенацилбромид не влиял на быструю фазу входа Ca^{2+} . Ингибитор циклооксигеназы индометацин никак не влиял на Ca^{2+} -сигнал. Ингибиторы Ca^{2+} -независимой ФлA2 бромэноллактон (bromoeno lactone) и пальмитоилтрифлуорэтилкетон (palmitoyl trifluoromethyl ketone) подавляли быструю фазу входа Ca^{2+} , активировали медленную и повышали общую амплитуду сигнала. Экзогенная арахидоновая кислота (AA) подавляла быстрый вход Ca^{2+} и понижала общую амплитуду сигнала, активируя Ca^{2+} -АТФазу плазматической мембраны. Таким образом, по действию ингибиторов Ca^{2+} -канал, активированный кальмидазолием в Т-лимфоцитах, аналогичен каналу клеток АКЭ. Предполагается, что R24571 вытесняет КМ из Ca^{2+} -независимой ФлA2, что приводит к ее активации. Активная ФлA2 генерирует два вторичных мессенджера. Первый активирует канал, а второй — ингибирует. Ингибиторы Ca^{2+} -независимой ФлA2 подавляют производство обоих мессенджеров. Мессенджеры образуются одновременно и в разных концентрациях, однако метаболизируются с разной скоростью различными ферментами. Таким образом, в результате исследований обнаружен новый тип Ca^{2+} -канала на плазматической мембране Т-лимфоцитов, активируемый ингибитором КМ R24571. Канал обладает высокой проводимостью, которая слабо зависит от температуры. Канал активируется с участием Ca^{2+} -независимой фосфолипазы A2. Природным ингибитором канала является AA.

ПЕРЕСТРОЙКИ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА В НОРМАЛЬНЫХ И ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТАХ ПРИ ЭКСТРАКЦИИ ХОЛЕСТЕРОЛА ИЗ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН. © Т. Н. Ефремова, С. Ю. Хайтлина, Е. А. Морачевская. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, elenmo@mail.cytspb.rssi.ru.

Холестерол (холестерин) является одним из основных липидных компонентов плазматической мембраны клеток млекопитающих. Известно, что динамические свойства липидного бислоя критически зависят от состава и концентрации стеролов в мембране, в первую очередь холестерина. Согласно современным представлениям, уровень мембранного холестерина имеет определяющее значение для структуры и целостности липидных микродоменов (рафтов) — участков, характеризующихся более плотной упаковкой и повышенным содержанием холестерина, сфинголипидов и насыщенных жирнокислотных остатков. На основании биохимических данных по экстракции интегральных белков высказываются предположения о роли рафтов в передаче сигнала с поверхности мембраны к внутриклеточным структурам, в частности в процессах реорганизации и динамики цитоскелета. Результаты электрофизиологических исследований функций ионных каналов в клетках лейкемии человека K562 и комплементарные данные флуоресцентной микроскопии позволяют полагать, что разрушение микродоменов приводит к формированию примембранных филаментов на базе имеющегося в суспензионных клетках пула глобулярного актина (Morachevskaya et al., 2007). В общем виде наша гипотеза состоит в том, что функциональный импакт деструкции микродоменов в

отношении актинового цитоскелета определяется в первую очередь балансом G- и F-актина; механизм включает в себя в качестве ключевого звена декэпирование микрофиламентов. Данная работа направлена на изучение состояния и выявление перестроек актиновых элементов цитоскелета в условиях деструкции богатых холестерином мембранных микродоменов. В качестве экспериментальной модели выбраны линии монослойных клеток млекопитающих, обладающие развитой в различной степени системой микрофиламентов. Исследования выполнены на «нормальных» (Balb 3T3) и трансформированных (Balb 3T3-SV40) эмбриональных фибробластах мыши (Российская коллекция клеточных культур). Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. Для визуализации микрофиламентов применяли стандартные методики фиксации клеток и окраски F-актина с помощью флуоресцентного красителя родамин-фаллоидина (2 мкг/мл, TRITC-phalloidin, Sigma). Для получения изображений использовали флуоресцентный микроскоп, возбуждая и регистрируя флуоресценцию при длинах волн 546 и 590 нм соответственно. Для частичной экстракции холестерина клетки инкубировали в присутствии метил- β -циклодекстрина (M β CD, 5 или 10 мМ) в среде без сыворотки; время инкубации составляло 60 или 120 мин. Обработка M β CD считается наиболее эффективным и адекватным методом для модификации стерольного состава мембран; снижение уровня холестерина приводит к разрушению липидных доменов в плазматической мембране. Результаты микроскопирования показали, что инкубация нормальных фибробластов 3T3 с M β CD приводит к разборке F-актина. Напротив, в трансформированных фибробластах 3T3-SV40 после экстракции холестерина наблюдали развитие актиновой сети и образование стресс-фибрилл. Полученные данные соответствуют нашей рабочей гипотезе о вероятной роли декэпирования (uncapping) микрофиламентов в процессе реорганизации актинового цитоскелета, которое инициируется при разрушении богатых холестерином мембранных микродоменов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 05-04-48209 и 05-04-49604).

3D-ОРГАНИЗАЦИЯ ИНТЕРФАЗНОГО ЯДРА У ДВУХ ВИДОВ БУРОЗУБОК, ЗНАЧИТЕЛЬНО РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ЧИСЛУ ЯО-РАЙОНОВ. © Н. С. Жданова, Т. В. Карамышева, Н. Б. Рубцов. Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск.

Ранее мы показали, что терминальные районы хромосом бурозубки *Sorex granarius* имеют необычную для хромосом млекопитающих организацию. На концах коротких плеч 32 акроцентриков локализованы длинные теломеры, содержащие до 300 т. п. н. теломерного повтора (в среднем 218 т. п. н.), причем по крайней мере часть теломерных повторов в них перемежается с рДНК. В этих же районах были выявлены активные ЯО-районы. Остальные теломеры у этого вида небольшие, в среднем 3.6 т. п. н. В отличие от *S. granarius* у его вида-близнеца *S. araneus* ЯО-районы локализованы на концах длинных плеч 8 хромосом, а размер теломер типичен для млекопитающих. Следует заметить, что кариотипы этих видов составлены из практически идентичных хромосомных

плеч и отличаются лишь Робертсоновскими перестройками. Известно, что теломерные, центромерные и ЯО-районы хромосом играют особую роль в архитектонике клеточного ядра. В связи с этим мы провели сравнительный анализ пространственной организации интерфазных ядер в первичных фибробластах *S. granarius* и *S. araneus* (хромосомная раса *cordon*). Трехмерная лазерная сканирующая микроскопия была использована для анализа результатов FISH (теломеры, кластеры рибосомных генов и центромеры) и иммуноокрашивания (белки ядрышек и центромерные районы). У обоих видов число сигналов после FISH при использовании в качестве зонда теломерной ДНК было существенно меньше числа теломер. У *S. granarius* выявленные районы теломерного сигнала были на порядок крупнее, чем у *S. araneus*, их число варьировало от 7 до 24, что свидетельствовало об ассоциациях теломерных районов, более выраженных у *S. granarius*, чем у *S. araneus*. Большинство теломер (около 80 %) находилось в контакте с ядерной оболочкой. Двухцветный FISH с использованием теломерного зонда и зонда рДНК/рРНК, а также с использованием теломерного зонда и мышинных антител к белку B23 ядрышка крысы позволил описать пространственную организацию ядрышек, которые характеризовались большими размерами. Была прослежена их связь с теломерами. У *S. araneus* в контакте с ядрышками находилось не более 8 теломер, тогда как у *S. granarius* — от 2 до 12. По-видимому, у *S. granarius* связь с ядрышком выявлялась только для тех теломер, в составе которых находилось достаточное число активных рибосомных генов. После обработки РНКазой в ядрах *S. granarius* наблюдалась колоколлизация сигналов, обусловленных теломерным и рДНК-зондами. Как правило, сигналы, обусловленные теломерным зондом, были крупнее, чем рДНК-зондом. Структур, напоминающих ядрышки, выявлено не было. Полученные данные позволяют считать, что не вся рДНК в составе длинных теломер *S. granarius* транскрипционно активна. В результате анализа клеток в различных фазах клеточного цикла была прослежена динамика формирования и разборки ядрышек у исследованных видов. В митотических клетках наблюдались распад и дальнейшее исчезновение ядрышек, при этом белок B23 выявлялся в метафазных и анафазных хромосомах. По-видимому, таким способом обеспечивается доставка белков ядрышек в соответствующие компартменты дочерних клеток, где они участвуют в сборке ядрышек. В результате проведенного исследования показано, что, несмотря на значительные различия в организации хромосом, их терминальных районов и числе ЯО-районов, у двух исследованных видов общие принципы пространственной организации ядрышек и их реорганизации в клеточном цикле оказались сходными. Вопрос об изменении взаимного расположения хромосомных территорий в интерфазном ядре, обусловленном различным участием хромосом в формировании ядрышек у исследованных видов бурозубок, остается открытым и требует дальнейшего изучения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 05-04-48221 и 07-04-00513).

ВРЕМЕННОЕ ПОДАВЛЕНИЕ РОСТА ПРИВИТОЙ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА. © Т. Н. Замай,

А. С. Замай. Сибирский федеральный университет, Красноярск.

Развитие канцерогенеза обусловлено повреждением механизмов дифференцировки, деления и элиминации клеток. И хотя опухолевым клеткам присущ автономный способ регуляции пролиферации, не вызывает сомнений, что организм способен оказывать непосредственное влияние на их рост и размножение. Наши исследования показали, что на определенной стадии развития опухоли организм сам способен подавлять опухолевый рост. Это явление было обнаружено нами при исследовании динамики роста карциномы Эрлиха. Выявленное подавление роста опухоли, после которого наступала новая фаза ускорения, было кратковременным и продолжалось в течение нескольких суток (Замай, Замай, 2006). Поскольку одним из наиболее важных факторов регуляции пролиферативной активности является ограничение питательных субстратов, необходимых для субстратного и окислительного фосфорилирования, мы предположили, что причиной подавления роста асцитной карциномы Эрлиха на 12-е сут после трансплантации опухоли мог стать дефицит питательных веществ и кислорода, который мог развиться вследствие интенсивного роста опухоли. Недостаток питательных веществ и гипоксия, как известно, могут подавлять синтез ДНК и вызывать апоптоз и некроз опухолевых клеток. Поэтому для того чтобы определить причину подавления роста карциномы Эрлиха, было важно в первую очередь оценить энергетический статус опухоли в динамике ее развития. Энергетическое состояние асцитных клеток оценивали с помощью метода ^{31}P -ЯМР-спектроскопии. На основании ^{31}P -ЯМР-спектров рассчитывали соотношение $\text{Pi}/\beta\text{-NTP}$. Именно этот показатель используется обычно для оценки энергетического статуса клетки (Eskey et al., 1993). Расчеты показали, что величина $\text{Pi}/\beta\text{-NTP}$ на 7-е сут, в период интенсивного роста опухоли, составляла 0.6 ± 0.1 . Уже на 9-е сут соотношение $\text{Pi}/\beta\text{-NTP}$ возросло до 2.5 ± 0.2 , а на 10-е уменьшилось (1.3 ± 0.2), но через 1 сут начало возрастать, и так продолжалось до 12-х сут, пока не приняло значение 3.8 ± 0.6 , однако к 13-м сут вновь снизилось и составило 1.2 ± 0.2 . 12-е сут характеризовались наиболее плохим энергоснабжением асцитных клеток ($\text{Pi}/\beta\text{-NTP}$ 3.75 ± 0.56). Удивительно, что именно в этот период мы наблюдали максимальное ускорение роста опухоли. Таким образом, проведенное нами исследование показало, что в условиях *in vivo* временное подавление роста асцитной карциномы Эрлиха не было обусловлено ухудшением энергетического состояния асцитных клеток. Вероятно, факторы, подавляющие рост опухоли, нужно искать на популяционном уровне или на уровне взаимодействия опухоли и организма-опухоленосителя. На уровне организма подавление роста могло осуществляться иммунными факторами. На уровне клеточной популяции торможение роста могло стимулироваться с помощью системы эндогенных белков-ингибиторов. Доказательства подавления роста опухоли эндогенными ингибиторами были получены Бихелем (Bichel, 1973) в опытах по введению асцитной жидкости из развитой опухоли мышам, у которых карцинома находилась в экспоненциальной фазе роста, причем остановка роста клеток происходила в фазе G_1 или G_2 и была недолговременной. После окончания действия ингибитора начиналась быстрая компенсаторная пролиферация. Такое поведение опухоли было характерным и в наших эксперимен-

тах — резкое уменьшение количества клеток в опухоли в течение 1 сут стимулировало пролиферативные процессы в асцитных клетках. Для подтверждения предположения о существовании белковых факторов, способных принять участие в подавлении роста асцитной карциномы Эрлиха, мы провели разделение белковых фракций диализированных асцитных жидкостей с помощью электрофореза на полиакриламидном геле. Исследование показало, что спектр белковых фракций асцитной жидкости на 11-е сут (период подавления роста опухоли) существенно отличался от спектра белковых фракций асцитной жидкости 7, 12 и 13-х сут (период активного опухолевого роста). Таким образом, исследования подтвердили наши предположения о существовании белковых факторов, которые могли бы оказывать влияние на рост асцитной карциномы Эрлиха.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ АКТИВАЦИИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА NF-κB ИНГИБИТОРАМИ HDAC В ТРАНСФОРМАНТАХ E1A+RAS.
© *Е. А. Затоловский,^{1,2} М. В. Абрамова,¹ С. Б. Светликова,¹ В. А. Поспелов.¹* ¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и ² С.-Петербургский государственный политехнический университет, zatulovskye@mail.ru.

Хорошей моделью для изучения свойств опухолевых клеток являются эмбриональные фибробласты мыши, трансформированные онкогенами E1A и cHa-ras (трансформанты E1A + Ras). Такие клетки по фенотипу сходны с раковыми клетками и в отличие от нормальных фибробластов не способны реализовывать блоки G₁/S и G₂/M клеточного цикла в условиях сывороточного голодания, при воздействии факторов стресса или ДНК-повреждающих агентов. Однако обработка ингибитором деацетилазы гистонов бутиратом натрия (NaBut) может вызывать у них G₁/S-блок клеточного цикла. При этом в трансформантах E1A + Ras в отличие от некоторых других типов трансформированных клеток не происходило апоптоза. Ранее мы показали, что обработка NaBut клеток, трансформированных онкогенами E1A и cHa-ras, значительно повышает в них активность транскрипционного фактора NF-κB, который играет существенную антиапоптотическую роль. Таким образом, кроме антипролиферативного действия NaBut вызывает в клетках также и антиапоптотический эффект. Этот факт заслуживает внимания, поскольку NaBut может значительно снижать эффективность противоопухолевой терапии с использованием ингибиторов HDAC. Понимание механизма, с помощью которого ингибиторы HDAC запускают в клетках антиапоптотический сигнал, способно помочь в разработке комплексной терапии, направленной не только на подавление пролиферации опухолевых клеток, но и на индукцию в них апоптоза. Для выявления сигнальных путей, задействованных в активации антиапоптотического транскрипционного фактора NF-κB в исследуемых трансформантах, мы методом люциферазного анализа исследовали влияние ингибиторов MAP-киназных каскадов, а также ингибитора PI3-киназы на уровень индуцированной бутиратом активации NF-κB-зависимой транскрипции. Как было показано ранее, уровень активности люциферазного репортера под контролем NF-κB-респонсивного элемента (3xNF-κB-luc) существенно возрастает в NaBut-обработанных клетках. Оказалось, что добавление ингибиторов

любого из киназных каскадов (Erk, Jnk и p38) или ингибитора PI3-киназы с разной степенью эффективности снижает уровень активации транскрипционного фактора NF-κB. Исследование совместного влияния NaBut с каждым из этих ингибиторов методом проточной цитофлуориметрии показало, что во всех рассмотренных случаях сохраняется индуцированный бутиратом блок клеточного цикла. Кроме того, в случае совместного действия NaBut с ингибитором p38-зависимого и особенно с ингибитором Jnk-зависимого сигнальных путей в распределении клеток по содержанию в них ДНК выявляется значительное количество субпиков, соответствующих менее диплоидному состоянию клеток, что может являться свидетельством фрагментации ядер и запуска в клетках апоптоза. Дополнительным свидетельством запуска апоптоза в трансформантах, обработанных NaBut совместно с ингибиторами p38-зависимого и Jnk-зависимого сигнальных путей, является снижение числа клеток на соответствующих этим обработкам кривых роста, построенных с помощью МТТ-теста. Обработка трансформантов E1A + Ras ингибиторами PI3-киназы и РКВ/Atk-киназы, а также соединением, ингибирующим доставку NF-κB в ядро, как и ожидалось, также вызывает снижение уровня NaBut-индуцированной активации транскрипционного фактора NF-κB, появление субпиков при проточной цитофлуориметрии и снижение числа клеток на кривых роста. Таким образом, в данной работе мы показали, что активация антиапоптотического транскрипционного фактора NF-κB в трансформантах E1A + Ras может быть обусловлена действием Jnk-зависимого и(или) p38-зависимого сигнальных путей.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О СВОЙСТВАХ И ФУНКЦИЯХ ЯДРЫШКА: ЯДРЫШКО КАК МИШЕНЬ СТРЕССОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ НА КЛЕТКИ.
© *О. В. Зацепина.* Институт биоорганической химии РАН, Москва, и Научно-исследовательский институт физико-химической биологии Московского государственного университета, zatsepina_olga@mail.ru.

Ядрышко — наиболее крупный структурный домен клеточного ядра, где происходят транскрипция рибосомных генов (рДНК), созревание первичных транскриптов 47—45S пре-рРНК и сборка прерибосомных частиц. Согласно последним данным протеомного анализа, ядрышки клеток человека HeLa содержат около 700 белков, а помимо основной функции — биогенеза рибосом — ядрышко и его белки участвуют также в других процессах, включая регуляцию апоптоза и клеточного цикла. Кроме того, согласно существующим представлениям, ядрышко является сенсором многих стрессовых воздействий на клетки, так что разрушение или повреждение его структурной целостности приводит к стабилизации основного регуляторного белка апоптоза — p53 — и в конце концов вызывает гибель клеток. Существенно, что во многих случаях ответ ядрышка на внешние воздействия отчетливо проявляется на клеточном уровне, специфичен и потому может служить индикатором биологической активности и механизмов действия различных факторов. Так, частичное или полное ингибирование транскрипции рДНК приводит к резкому уменьшению размеров ядрышка и сегрегации его главных структурных компонентов, включая фибриллярные центры — «депо» неактивных рибосомных генов и РНК полимеразы I, плотного

фибрилярного компонента (территория, где происходит созревание пре-рРНК) и гранулярного компартмента, служащего местом формирования рибосомных частиц. Напротив, ингибирование киназ, фосфорилирующих основные ядрышковые белки (B23/нуклеофозмин, нуклеолин, UBF и др.), сопровождается резким и характерным «разворачиванием» ядрышек. Существенно, что в результате всех перечисленных воздействий наблюдается гибель клеток путем апоптоза. Наши наблюдения показывают также, что состояние ядрышек в опухолевых клетках человека HeLa и MCF-7 высокочувствительно к подавлению тотального белкового синтеза. Реакция ядрышек на ингибиторы трансляции — циклогексимид и анизомицин — проявляется в быстрой миграции специфического кофактора РНК полимеразы I белка UBF из ядрышка в нуклеоплазму и предшествует гибели клеток путем апоптоза. Существенно, что в наибольшей степени эти изменения проявляются в клетках, находящихся в состоянии репликации ДНК (S-период клеточного цикла). Хотя причины наблюдаемой реакции остаются неизвестными, эти данные хорошо соответствуют существующим представлениям об участии ядрышка в регуляции апоптоза и клеточного цикла в целом.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 05-04-081310-а и 06-04-49392).

МОДЕЛИРОВАНИЕ КАЛЬЦИЕВЫХ ВОЛН В КЛЕТКАХ. © В. П. Зинченко, А. В. Бережнов, Б. Н. Клочков, В. Г. Яхно. Институт биофизики клетки РАН, vprz@mail.ru, и Институт прикладной физики РАН, Пушкино, yakhnop@awp.pnov.ru.

Известно, что клетки обычно обладают поразительной чувствительностью. Они могут реагировать на присутствие одной молекулы или одного фотона. Это обусловлено наличием систем амплификации сигналов. До развития биофизики клетки результат воздействия изучали по реакции целого организма или отдельного органа (секреция, сокращение мышцы, активность мозга и т. д.). Внутриклеточная сигнализация стала одной из важнейших областей биологических исследований. Оказалось, что, несмотря на обилие лигандов и рецепторов, существует ограниченное число систем передачи сигнала на исполнительные механизмы клетки. Одной из основных является система контроля пространственного распределения Ca^{2+} . Экспериментально изменения концентрации Ca^{2+} в клетках регистрируют с помощью специальных флуоресцентных зондов. На примерах распространения внутриклеточной Ca^{2+} -волны в кардиомиоцитах и межклеточной Ca^{2+} -волны в монослойе клеток асцитной карциномы Эрлиха показано, что АТР индуцирует Ca^{2+} -сигнал и импульсную секрецию АТР. Секретируемый АТР взаимодействует с пуринорецепторами на соседних клетках и индуцирует в них Ca^{2+} -сигнал и Ca^{2+} -волну. В результате Ca^{2+} -волна передается от клетки к клетке. Таким образом, изменения Ca^{2+} участвуют в процессе функционального взаимодействия клеток в ткани. Для исследования функциональных особенностей таких динамических процессов была предложена и рассмотрена математическая модель с протяженными дискретно распределенными источниками Ca^{2+} , описывающая изменения концентрации Ca^{2+} внутри клетки, выво-

ждаемых из саркоплазматического ретикулума (СР). Были рассмотрены характерные режимы автоволновой активности спонтанного сокращения мышечной клетки. Показано, что в первоначально однородно возбужденной клетке возможны простое распространение Ca^{2+} -волны, сложный (квазихаотический, типа биения) режим с постепенной расфазировкой колебаний отдельных участков клетки, эффекты синхронизации или сложные распределенные автоколебания. Полученные из модели оценки для $V_{фр.}$ скорости фронта кальциевой волны достаточно хорошо соответствуют известным экспериментальным данным: $V_{фр.}$ лежит в диапазоне 50—150 мкм/с, а ширина фронта повышения концентрации ионов кальция — в диапазоне 3—0 мкм. Кроме того, была отмечена определенная качественная закономерность в реакции скорости фронта $V_{фр.}$ на изменения свойств клетки. В соответствии с рассмотренной моделью в эксперименте должно наблюдаться прекращение процесса распространения волны под действием веществ, уменьшающих проницаемость мембраны СР для Ca^{2+} . При этом приближение к границе существования фронта должно сопровождаться увеличением скорости распространения Ca^{2+} -волны. Дальнейшее сопротивление пространственно-временной динамики кальциевых сигналов, полученных в экспериментах и модельных расчетах, позволит проводить более детальное изучение механизмов регуляции функциональных состояний клеток и клеточных систем.

НОКАУТ ПО СТРЕСС-КИНАЗАМ JNK1, 2 ЛИШАЕТ ТРАНСФОРМАНТЫ МЫШИ СПОСОБНОСТИ РЕАКТИВИРОВАТЬ ПРОГРАММУ УСКОРЕННОГО СТАРЕНИЯ. © С. Г. Зубова, Т. В. Быкова, Ю. Г. Зубова, Н. Д. Аксенов, В. А. Поспелов, Т. В. Поспелова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, jul_zubova@mail333.com.

Способность клеток претерпеть старение связана с необратимым блоком клеточного цикла. Ускоренное старение не связано с укорочением теломер и является антиканцерогенной программой, которая предохраняет клетку от злокачественного перерождения. Ускоренное старение индуцируется онкогенами или стрессорными факторами, включая ультрафиолет, гамма-облучение, воспалительные цитокины и цитостатики, а также действием ингибиторов гистоновых деацетилаз. Под влиянием стрессорных факторов в клетке может включаться либо апоптотическая программа уничтожения дефектных клеток, либо программа старения. Оба этих процесса связаны с активацией стресс-киназных сигнальных путей. В связи с этим целью работы было выяснение роли разных стресс-киназ в индукции процесса ускоренного старения, индуцированного ингибитором гистоновых деацетилаз бутиратом натрия. Мы обнаружили, что трансформанты E1A + cHa-ras, полученные из эмбриональных фибробластов мышей, нокаутных по стресс-киназе p38 α , могут необратимо останавливаться на границе фаз G₁/S при действии бутирата натрия в течение 5 сут. После отмывки бутирата они не способны входить в фазу репликации ДНК и пролиферировать, в них наблюдается экспрессия маркера старения — SA- β -галактозидной активности. Эти данные позволяют предполагать, что реализация процесса старения в трансформированных клетках грызунов возможна в отсутствие функционально активного гена киназы p38 α . С использованием

трансформантов E1A + cHa-gas, полученных из эмбриональных фибробластов мыши, нокаутных по стресс-киназам JNK1, 2, было обнаружено, что они не способны останавливаться в цикле после действия бутирата натрия в течение 5 сут, в них не выявляется маркер старения — SA-β-галактозидазная активность. Полученные данные позволяют предполагать, что в трансформантах мыши, полученных комплементацией онкогенов E1A + cHa-gas, в отличие от человеческих опухолевых клеточных линий ускоренное старение зависит не от активации p38α-киназы, а от стресс-киназ JNK1, 2. Эти данные свидетельствуют в пользу возможных опухоль-супрессорных свойств киназ JNK1, 2, поскольку индукция старения в трансформантах, препятствующая пролиферации опухолевых клеток, может идти только в присутствии белков стресс-киназ JNK1, 2.

РЕАКТИВНОСТЬ МЕМБРАН ЯДЕРНОЙ ОБОЛОЧКИ В ХОДЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК ТРОФОБЛАСТА И В ХОДЕ ДЕПОЛИПЛОИДИЗАЦИИ И ФРАГМЕНТАЦИИ ГИГАНТСКОГО ЯДРА. © Е. В. Зыбина, Т. Г. Зыбина. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

В ходе дифференцировки двух популяций клеток трофобластов в плаценте крысы на электронно-микроскопическом уровне наблюдалась значительная активность ядерной оболочки (ЯО), выраженная в образовании целого ряда ее производных. Как в низкополиплоидных активно пролиферирующих клетках трофобласта соединительной зоны плаценты, так и во вторичных гигантских клетках трофобласта в ядрах встречались значительное количество annulate lamellae (AL), скопленных поровых комплексов, внутриядерных мембранных трубочек и концентрических мембранных структур. В период терминальной дифференцировки вторичных гигантских клеток трофобласта производные ЯО играют активную роль в быстром разделении исходного высокополиплоидного ядра на множество низкополиплоидных фрагментов. В участках обособления фрагментов усиливается складчатость ЯО и накапливается большое количество производных ЯО — внутриядерных AL, мембранных трубочек, кластеров поровых комплексов и т. п., которые представляют собой резервный материал, необходимый, по-видимому, для построения мембран ЯО многочисленных ядерных фрагментов. В ходе фрагментации ядра глубокие узкие инвагинации ЯО подразделяют ядро на отдельные доли, которые впоследствии отделяются от исходного ядра. Таким образом, если в начале дифференцировки внутриядерные мембранные структуры служат, по-видимому, для увеличения активной поверхности растущего эндополиплоидного ядра, то на поздних стадиях дифференцировки они также играют значительную роль в превращении высокоэндополиплоидной (256с—1024с) клетки в многоядерную с диплоидными и низкополиплоидными ядрами. Наружная мембрана ЯО исходного ядра играет активную роль в компартиментализации цитоплазматических территорий вокруг ядерных фрагментов внутри гигантского поликариоцита.

КЛОНИРОВАНИЕ, ОЧИСТКА И КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ДРОЖЖЕВОГО БЕЛКА Yip3. © А. В. Игнатьев,¹ А. В. Рак.² ¹ Институт теоретической

и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, и ² Институт молекулярной физиологии, Дортмунд, Германия, alvign@rambler.ru.

Белок Yip3 является членом семейства трансмембранных белков Yip (Yip interacting proteins), открытых как белки, взаимодействующие с белками семейства Rab/Ypt, малыми ГТФазами, участвующими в регуляции везикулярного транспорта. В настоящее время белки семейства Yip обнаружены как в клетках дрожжей, так и в клетках различных тканей млекопитающих. Однако локализация внутри клеток известна лишь для некоторых белков Yip. Экспериментально было показано, что белки Yip потенциально могут выступать в качестве факторов GDF (GDI Displacement Factors) или рецепторов, находящихся в мембранах внутриклеточных компартментов, обеспечивая диссоциацию высокоаффинного комплекса Rab(GDP)—GDI, в форме которого осуществляется транспорт белков Rab/Ypt между мембранами внутриклеточных компартментов. Освобожденные от GDI (GDP dissociation inhibitor) белки Rab/Ypt встраиваются в мембрану донорного компартмента посредством пренильных групп, которые ковалентно присоединяются к С-концевым цистеиновым остаткам Rab/Ypt в процессе посттрансляционной модификации. После интегрирования в мембрану ГТФ-связанные белки Rab/Ypt, взаимодействуя с эффекторными молекулами, активируют тот или иной этап везикулярного транспорта. Тем не менее механизмы рецепции и диссоциации комплекса Rab—GDI, встраивания Rab/Ypt в мембрану посредством белков Yip, а также трехмерные структуры белков Yip на данный момент неизвестны. Для определения структуры и проведения биохимических исследований нами предпринята попытка получения рекомбинантного полноразмерного дрожжевого белка Yip3. На основе экспрессионных векторов pGATEV и pET19 были получены генетические конструкции, содержащие кДНК Yip3 в одной рамке считывания с глутатион-S-трансферазным доменом (GST) или 6xHis-фрагментом соответственно. Очистку рекомбинантных белков проводили при помощи аффинной хроматографии на глутатион-сефарозной или Ni-NTA-агарозной колонке, после чего примеси удаляли гель-фильтрацией. Очищенные химерные белки без удаления глутатион-S-трансферазного домена и 6xHis-фрагмента использовали для кристаллизации методом сидячей капли при различных кристаллизационных условиях, а также методом липидных кубических фаз. Последний метод основан на создании системы, образованной билипидными липосомами, которые находятся в водной фазе. При этом трансмембранный белок своей гидрофобной частью включается в билипидные липосомы, тогда как гидрофильные участки обращены в водную среду. В полученную систему для формирования белковых кристаллов добавляются преципитирующие агенты. При кристаллизации методом сидячей капли белки не формировали кристаллов, что может быть связано с агрегацией молекул белка или недостаточно правильным фолдингом. В липидных кубических фазах были получены кристаллы, которые предполагается использовать для дальнейшего рентгеноструктурного анализа. Однако данный метод предполагает большие временные затраты для подбора условий, в которых могут быть получены кристаллы, подходящие для их использования в рентгеноструктурном анализе. В «pull-down»-экспериментах на глутатион-сефарозной и(или) Ni-NTA-

агарозной смолах, на которых был аффинно связан соответствующий рекомбинантный белок, при добавлении комплекса GDI с пренилированным Ypt1 (дрожжевым белком Rab) GDI вытеснялся из комплекса. Белок Ypt1 при этом преципитировал, так как свободный пренилированный белок Rab/Ypt1 является нерастворимым. Этот эксперимент подтверждает способность белка Yip3 потенциально выступать в качестве фактора, распознающего и диссоциирующего комплекс GDI—Rab.

ЭВОЛЮЦИОННЫЙ КОНСЕРВАТИЗМ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ТОТИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК Metazoa. © В. В. Исаева,¹ А. И. Шукалюк,^{1,2} А. В. Ахмадиева,¹ Я. Н. Александрова.¹ ¹ Институт биологии моря ДВО РАН, Владивосток, и ² Лаборатория биологии стволовых клеток и функциональной генетики, Университет г. Торонто, Канада.

У животных с бесполом размножением линия самообновляющих тотипотентных, по крайней мере мультипотентных, клеток поддерживается в течение всей жизни организма; тотипотентные стволовые клетки сохраняют способность дифференцироваться как в соматические клетки всех типов, так и в половые клетки. С целью сравнительного исследования эволюционно-консервативных субклеточных и молекулярных основ тотипотентности использованы эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) мыши как относительно изученный «эталон» и стволовые клетки размножающихся бесполом путем беспозвоночных животных. Исследованы стволовые клетки колониальных беспозвоночных: асцидии *Botryllus tuberatus*, корнеголовых паразитических ракообразных *Peltogasterella gracilis*, *Polyascus polygenea* и *Thylacoplethus isaevae*, гидроида *Obelia longissima*, а также размножающейся бесполом путем турбеллярии *Dugesia tigrina*. Впервые обнаружены почкующиеся столоны и стволовые клетки корнеголовых ракообразных, уникальных представителей членистоногих с колониальной организацией, и стволовые клетки колониальной асцидии с паллеальным почкованием. Герминальные гранулы зародышевой (половой) плазмы изучены в качестве ультраструктурного маркера и ключевого органоида тотипотентных стволовых клеток. Молекулярным маркером выбран известный своей локализацией в гранулах половой плазмы различных представителей Metazoa продукт эволюционно-консервативного гена *vasa* и его гомологов, предположительно вовлеченных в детерминацию клеточной тотипотентности. В качестве маркера клеточной репродукции самоподдерживающейся линии стволовых клеток применен ядерный антиген пролиферирующих клеток (proliferating cell nuclear antigen — PCNA) мыши. В качестве цитохимического маркера стволовых клеток беспозвоночных животных использована активность щелочной фосфатазы, выявление которой в клетках позволяет идентифицировать ЭСК и первичные половые клетки позвоночных. Стволовые клетки всех исследованных нами представителей различных типов Metazoa характеризуются присутствием герминальных гранул или мелкодисперсного материала nuage зародышевой плазмы. В стволовых клетках обнаружены селективная экспрессия ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA) и активность щелочной фосфатазы. Интенсивность цитохимической реакции выявления активности щелочной фосфатазы в стволовых

клетках изученных беспозвоночных подобна найденной в ЭСК мыши, использованных в качестве контроля. Все или большинство blastomeres дробящихся эмбрионов *P. polygenea* содержат крупные герминальные гранулы, т. е. у этого колониального представителя корнеголовых не происходит ранней сегрегации полового зачатка в отличие от других ракообразных и всех членистоногих. Найдены интенсивная избирательная экспрессия гена, родственного *vasa*, в стволовых и половых клетках, а также локализация белкового продукта этого гена в герминальных гранулах blastomeres *P. polygenea*. Локализация продукта гена родственного *vasa*, обнаружена также в герминальных телах и материале nuage ЭСК мыши. Эти результаты вместе с данными других исследователей свидетельствуют об эволюционном консерватизме морфофункциональной организации и общности субклеточных и молекулярных основ тотипотентности стволовых клеток всех исследованных в этом аспекте многоклеточных животных, включая изученных нами представителей столь различных типов, как Cnidaria, Turbellaria, Arthropoda и Chordata. У беспозвоночных животных с бесполом размножением самообновляющийся резерв тотипотентных стволовых клеток служит источником клеточного материала и клеточной основой реализации репродуктивной стратегии, включающей в себя и половое, и бесполое размножение.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 06-04-48744, 06-04-63092 и 06-04-96039) и ДВО РАН (проект 06-III-A-06-162).

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТИОЛМОДИФИЦИРУЮЩИХ MTS-РЕАГЕНТОВ С ИОННЫМИ КАНАЛАМИ ВОЗБУДИМЫХ И НЕВОЗБУДИМЫХ МЕМБРАН. © Н. В. Кабанова, В. Н. Казаченко. Институт биофизики клетки РАН, Пушкино, kabanovatata@mail.ru.

Ионные каналы являются неотъемлемыми ионтранспортирующими компонентами клеточных мембран, имеют белковую природу и различаются по молекулярной массе, строению, упаковке в мембране и специфическим свойствам, определяющим их участие в клеточном метаболизме. Исследования одиночных ионных каналов позволяют более полно описать мембранные процессы и направлены, как правило, на изучение характеристик «воротного» механизма ионного канала. «Воротный» механизм ионных каналов подвержен влиянию различных внутри- и внеклеточных факторов, что в итоге выражается в изменении параметров активности каналов. Из всего спектра воздействий, изменяющих характер активности ионных каналов, окислительно-восстановительное воздействие на белковую молекулу канала имеет сильно выраженные последствия и лежит в основе многих патологий. Удобной моделью для проведения исследований одиночных ионных каналов на электровозбудимых мембранах служат нейроны моллюсков, в частности нейроны большого прудовика *Lymnaea stagnalis*, а на невозбудимых мембранах — культуры клеток определенных типов тканей. В нашей работе объектом исследования ионных каналов невозбудимых мембран служили почечные клетки линии *Vero*. Используя метод точечной фиксации потенциала (пэтч-метод) на изолированных мембранных фрагментах (модификация inside-out пэтч-мето-

да), мы исследовали взаимодействие MTS-реагентов — производных метантиосульфата — с потенциалозависимыми K^+ -каналами (K_v^+ -каналами) нейронов прудовика и Ca^{2+} -активируемыми K^+ -каналами (K_{Ca}^+ -каналами) клеток линии *Vero*. Эти реагенты избирательно и быстро взаимодействуют с доступными тиоловыми группами белка, приводя к образованию ковалентной дисульфидной связи между белком и радикалом MTS-реагента, и тем самым модифицируют приводящую функцию канала. Помимо того, что они являются высокоэффективными «метками» остатков цистеина в структуре белка, MTS-реагенты могут использоваться для изучения последствий изменения редокс-статуса белков при окислении их тиолмодифицирующими метаболитами клетки. Мы использовали два положительно заряженных MTS-реагента: MTSET — [2-(триметиламмоний)этил] метантиосульфат бромид и MTSEA-Chloride — (2-аминоэтил) метантиосульфат гидрохлорид. Наши исследования показали, что на фоне действия 2 мМ MTSET и 2 мМ MTSEA-Chloride ток через K_{Ca}^+ -каналы и K_v^+ -каналы снижался в среднем на 37 % от контроля, в некоторых случаях частично обратимо. Вероятность нахождения каналов в открытом состоянии (P_o) под действием MTS-реагентов в большинстве случаев необратимо снижалась. Изменение значений P_o было вызвано изменением времени нахождения каналов в открытом (t_o) и закрытом (t_c) состояниях. Необратимое снижение P_o было следствием снижения t_o и увеличения t_c в среднем на 44 и 40 % от контроля соответственно. MTS-реагенты вызывали также изменения в характере потенциалозависимости кинетических параметров активности исследуемых каналов, что, по-видимому, являлось следствием конформационных изменений канального белка, вызванных MTS-модификацией. Необратимые изменения параметров активности каналов восстанавливались только при добавлении в реакционную среду 1 мМ DTT. Таким образом, анализируя результаты взаимодействия MTS-реагентов с одиночными K_v^+ - и K_{Ca}^+ -каналами, можно сказать, что оба типа каналов могут подвергаться модифицирующему действию тиоловых реагентов с цитоплазматической стороны канального белка. В структуре ионной поры данных канальных белков имеются свободные SH-группы, доступные действию окислителей, модификация которых приводит к изменению кинетики «воротного» механизма исследуемых каналов. Учитывая роль данных каналов в метаболизме клеток, в структуру мембран которых входят эти типы каналов, можно сказать, что нарушение их функции может привести к нарушению всего метаболизма клетки и как следствие — к формированию патологии. Качественной разницы эффектов действия MTSET и MTSEA-Chloride на исследуемые типы каналов нами обнаружено не было.

МЕХАНИЗМЫ ХРОМОСОМНЫХ ПЕРЕСТРОЕК В КЛЕТКАХ, ОБРАБОТАННЫХ ИНГИБИТОРАМИ ДНК-ТОПОИЗОМЕРАЗЫ II. © О. Л. Кантудзе,¹ С. В. Разин.^{1,2} ¹ Институт биологии гена РАН, Москва, и ² Кафедра молекулярной биологии Московского государственного университета.

В клетках, обработанных ингибиторами ДНК-топоизомеразы II, часто происходят различные хромосомные перестройки. Эти перестройки являются причиной развития вторичных лейкозов у пациентов, прошедших

курс химиотерапии с использованием ингибиторов ДНК-топоизомеразы II. Механизмы возникновения хромосомных перестроек в клетках, обработанных ингибиторами ДНК-топоизомеразы II, остаются не вполне ясными. Согласно одной гипотезе, сама топоизомераза II способна осуществлять перенос цепей ДНК, причем эта активность усиливается при ингибировании лигирующей активности фермента. Другая гипотеза заключается в том, что основной причиной хромосомных перестроек в клетках, обработанных ингибиторами топоизомеразы II, является активация репарационных систем, ошибки в работе которых и приводят к возникновению хромосомных перестроек. Мы продемонстрировали, что вносимые топоизомеразой II разрывы ДНК узнаются системами мониторинга целостности ДНК, о чем свидетельствует появление фокусов гистона γ H2A.X Эти фокусы локализуются преимущественно на ядерном матриксе, и это свидетельствует о том, что разрывы в ДНК вносятся преимущественно в местах прикрепления ДНК к ядерному матриксу. С использованием иммуноокрашивания и конфокальной микроскопии мы продемонстрировали, что внесенные топоизомеразой II разрывы ДНК стимулируют сборку белковых комплексов, участвующих в негомологичном соединении концов ДНК (Ku, DNA-PK_{cs}, DNA-ligase IV). Это наблюдение было подтверждено и с использованием другого экспериментального подхода (иммунопреципитации хроматина антителами против белков, участвующих в негомологичном соединении концов ДНК и гомологичной рекомбинации). Было показано, что после обработки клеток ингибиторами топоизомеразы II с картированным ранее кластером хромосомных перестроек в гене AML-1 связываются белки, осуществляющие негомологичное соединение концов ДНК (Ku и DNA-PK_{cs}), но не белки системы гомологичной рекомбинации (RAD 52). В целом полученные результаты позволяют утверждать, что основной причиной возникновения хромосомных перестроек в клетках, обработанных ингибиторами ДНК-топоизомеразы II, являются ошибки в работе системы репарации двухнитевых разрывов ДНК посредством негомологичного соединения концов ДНК.

ПОЛУЧЕНИЕ МИКРОДИССЕКЦИОННЫХ ХРОМОСОМО- И РАЙОНОСПЕЦИФИЧНЫХ ЗОНДОВ ДЛЯ АНАЛИЗА ХРОМОСОМНЫХ ПЕРЕСТРОЕК В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА. © Т. В. Карамышева,¹ М. А. Прохорович,¹ М. А. Лагерькова,³ С. Л. Киселев,³ Н. Б. Рубцов.^{1,2} ¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, rubt@bionet.nsc.ru, ² Новосибирский университет и ³ Институт общей генетики РАН, Москва.

Показано, что постоянный цитогенетический контроль культивируемых клеток позволяет осуществлять длительное культивирование эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека с сохранением их нормального кариотипа. Для этого требуется отбраковка субклин, в кариотипах клеток которых присутствуют стабильные перестроенные хромосомы. В то же время при условии детального описания перестроенных хромосом такие субклин могут оказаться мощным инструментом для изучения роли конкретных хромосомных районов в поддержании плюрипотентности ЭСК и определении спектра их возможной дифференцировки. Одним из необходи-

мых условий проведения таких исследований является описание хромосомных перестроек на высоком уровне разрешения. Анализ дифференциально окрашенных хромосом эмбриональных стволовых клеток человека позволяет выявить различные хромосомные перестройки. Однако надежная идентификация хромосомных районов и точная локализация точек разрывов и воссоединений, сопровождающих перестройки, представляются невозможными без использования методов молекулярно-цитогенетического анализа. В данной работе с помощью метода микродиссекции и последующей амплификации материала метафазных хромосом и их отдельных районов был получен набор различных хромосо- и районспецифичных ДНК-зондов, предназначенных для анализа конкретных хромосомных аномалий, выявленных в сублиниях hESM01r18 и hESM03der9 ЭСК человека. Для картирования точек разрывов были получены ДНК-зонды, специфичные к аномальным хромосомам. Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) позволила определить состав и точки разрывов дериватов хромосом 4 и 18. В результате проведения этих экспериментов дериват хромосомы 4 был описан как del(4)(q25q31.1). Дополнительный анализ с использованием FISH полученного микродиссекционного ДНК-зонда, приготовленного из der(18), с метафазными хромосомами клеток сублинии hESM01r18 и ДНК-пробы, выявляющей теломерные повторы, показал, что аномальная хромосома 18 представляет собой r(18)::p11.31→q21.2::q21.2→11.31::). Результаты дифференциального окрашивания и FISH микродиссекционного ДНК-зонда, приготовленного из der(9), с метафазными хромосомами клеток сублинии hESM03der9 указывали на дубликацию части материала хромосомы 9. Для уточнения точек разрывов была получена серия районспецифичных зондов. В результате последующих экспериментов с использованием всех полученных ДНК-зондов было установлено, что der(9) является dup(9)(q12q33), а кариотип hESM03der9 представляет собой 46,XX,del(4)(q25q31.1),dup(9)(q12q33). Проведение полного детального молекулярно-цитогенетического анализа клеток сублиний hESM01r18 и hESM03der9 открывает возможности их использования в качестве модельных объектов для изучения значения отдельных хромосомных районов в определении и поддержании статуса плюрипотентности ЭСК, а также в исследованиях, посвященных изучению принципов пространственной организации интерфазного ядра и ее значения в определении уровня клеточной дифференцировки.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 05-04-48221) и по проекту «Генетическая и клеточная пластичность линий ЭСК человека» (госконтракт 02.512.11.2060).

ЭКСПРЕССИЯ Na^+ , K^+ -АТФАЗЫ В АКТИВИРОВАННЫХ ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА. © И. А. Карицкая, И. О. Васильева, Т. А. Виноградова, И. И. Марахова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Действие цитокинов и ростовых факторов и запуск клеточной пролиферации сопровождаются активацией основных ионтранспортирующих систем плазматической мембраны, а изменения внутриклеточной концентрации ионов кальция, натрия и рН цитозоля являются

компонентами раннего ответа клеток на митогенный сигнал. В работе исследованы транспортная функция Na^+ , K^+ -насоса (измерение ингибируемых убаином входных потоков рубидия, аналога калия), связывание меченого ^3H -убаина (оценка числа Na^+ , K^+ -АТФазных помп в плазматической мембране), экспрессия Na^+ , K^+ -АТФазы на уровне белка (оценка методом иммуноблотинга содержания каталитической $\alpha 1$ -субъединицы Na^+ , K^+ -АТФазы) и мРНК (оценка методом RT-PCR), внутриклеточное содержание калия и натрия, кинетика запуска пролиферации и экспрессия высокоаффинного рецептора интерлейкина-2 (ИЛ-2) у лимфоцитов периферической крови человека (ЛПК), стимулированных фитогемагглютинином (ФГА), форболовым эфиром (ФДБ) с иономицином (ИМ) или интерлейкином-2 (ИЛ-2). Показано, что в покоящихся лимфоцитах ФГА и сочетание ФДБ с ИМ индуцируют пролиферативный и ростовой ответы, которые сопровождаются устойчивым 5-кратным повышением входа рубидия в клетку и возрастанием внутриклеточного содержания калия на поздних стадиях перехода $G_0/G_1/S$. Входной поток рубидия возрастает за счет ингибируемых убаином потоков, что свидетельствует о повышении активности Na^+ , K^+ -насоса во время бласттрансформации ЛПК. Измерение специфического связывания ^3H -убаина показало, что высокие входные потоки рубидия на поздних стадиях перехода $G_0/G_1/S$ обеспечиваются возросшим числом работающих Na^+ , K^+ -помп в плазматической мембране. Методом иммуноблотинга выявлено нарастание количества альфа1-субъединицы Na^+ , K^+ -АТФазы в мембранных фракциях тотальных лизатов лимфоцитов, коррелирующее с нарастанием уровня потоков через Na^+ , K^+ -насос на стадии роста и образования бластов в культуре активированных ЛПК. Обнаружено увеличение уровня $\alpha 1$ - и $\beta 1$ -мРНК Na^+ , K^+ -АТФазы в первые 5 ч, сохраняющееся далее в течение 24 ч стимуляции лимфоцитов ФГА или ФДБ с ИМ. Установлено, что возрастание транспортной активности ионного насоса сопряжено с ИЛ-2-зависимой стадией перехода $G_0/G_1/S$. Использование специфических фармакологических ингибиторов, выключающих отдельные сигнальные пути с рецептора ИЛ-2, позволило установить, что протеинкиназы ERK1/2 (MAP-киназный путь) и JAK3 (JAK-STAT-путь) принимают участие в регуляции экспрессии Na^+ , K^+ -АТФазы при переходе нормальных лимфоцитов человека к пролиферации. Сделан вывод о том, что в активированных ЛПК человека повышенная активность натриевого насоса во время пререпликативной стадии перехода $G_0/G_1/S$ обеспечивается за счет увеличения числа функционирующих молекул натриевого насоса в плазматической мембране, которое контролируется T-клеточным ростовым фактором ИЛ-2 на уровне транскрипции и(или) транскрипции.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-48445-а) и в виде гранта президента РФ по проекту «Ведущие научные школы» (грант 523.2006.4).

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ БЕЛКОВ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА РЕТИКУЛОНОВ, СТАБИЛИЗИРУЮЩИХ ИЗГИБ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН. © Е. В. Киселева,¹ К. Н. Морозова,¹ Г. Воллу,² М. В. Голдберг.³ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, ² Колорадский университет, Ко-

лорадо, США, и ³ Дурхамский университет, Великобритания, elka@bionet.nsc.ru.

Открытые недавно ретикулоны относятся к интегральным белкам внутриклеточных мембран, вовлеченных, как предполагают, в регуляцию многих внутриклеточных процессов. Ранее было установлено, что ретикулоны индуцируют формирование трубчатого эндоплазматического ретикулума (ЭПР) в условиях *in vitro* (Woelz et al., 2006), что позволило предположить ведущую роль этих белков в стабилизации изгиба внутриклеточных мембран. Наши предыдущие исследования показали, что трубчатые мембраны ЭПР часто выявляются вблизи хроматина на ранних стадиях сборки ядерной оболочки. Цель настоящего исследования — определение мест локализации ретикулонов на мембранах ЭПР, а также выяснение возможной роли этих белков в сборке ядерной оболочки. Эксперименты проводили *in vivo*, на ранних ооцитах амфибий, а также *in vitro*, при сборке ядер в условиях инкубации экстрактов из ооцитов амфибий и компактного хроматина. Использовали моноклональные антитела к Rtn4a, просвечивающую и высокоразрешающую сканирующую электронную микроскопию (FEI-SEM). Впервые с помощью FEI-SEM установлено, что ретикулон локализуется в участках контакта и сплавления пузырьков ЭПР в цитоплазме. Белок выявлялся также вдоль края мембран уплощенных пузырьков ЭПР, сплавляющихся с наружной мембраной ядерной оболочки растущих ооцитов, и на наружной мембране ядра, однако отсутствовал на внутренней мембране ядерной оболочки. Полученные данные свидетельствовали в пользу участия данного белка в регуляции сборки ядерной оболочки растущего ядра. Это было проверено в условиях *in vitro*. Добавление антител в инкубационную среду при сборке ядер не препятствовало формированию ядерной оболочки и ядерных пор вокруг компактного хроматина на начальных стадиях этого процесса, однако полностью блокировало последующий рост ядерной оболочки. При этом наблюдалось появление крупных пузырьков и цистерн ЭПР, контактирующих, но не сливающихся с наружной ядерной мембраной, вероятно за счет ингибирования действия ретикулон. Эти данные могут свидетельствовать о том, что регуляция механизмов сплавления мембран в процессах сборки ядерной оболочки в митотически делящихся и интерфазных ядрах различается. Предполагается, что ретикулон Rth4 стабилизирует кривизну мембран, обеспечивая сплавление мембран ЭПР с наружной мембраной растущих неделящихся ядер.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 07-04-00416-а) и в виде гранта фонда Велком Траст (Великобритания).

ЭКСПРЕССИЯ мРНК ТРОМБОСПОНДИНА В МАКРОФАГАХ И ТИМОЦИТАХ МЫШЕЙ ПРИ ОПУХОЛЕВОМ РОСТЕ. © Е. П. Киселева, А. В. Крылов, В. И. Людьюно, Г. М. Алешина. Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург.

Тромбоспондин-1 (TSP-1) относится к матриксно-клеточным белкам, основной функцией которых в отличие от белков внеклеточного матрикса является регу-

ляторная функция, а не структурная. Он продуцируется многими клетками организма, в том числе макрофагами, эндотелиальными клетками Т-лимфоцитами. Особенностью молекулы TSP-1 является наличие на разных ее участках сайтов связывания с различными клеточными рецепторами и белками, что позволяет ей служить «мостиком» в межклеточных взаимодействиях. TSP-1 считается антиангиогенным фактором и способен ингибировать пролиферацию, миграцию и другие функции эндотелия *in vitro*, а также блокировать действие ангиогенных факторов *in vivo* (DiPietro et al., 1994). Кроме того, TSP-1 усиливает адгезию и миграцию Т-лимфоцитов (Forslow et al., 2007). Известно, что экспрессия TSP-1 повышается в пролиферирующих клетках, очаге воспаления, регенерирующих тканях и опухолях. Целью настоящего исследования было изучение синтеза TSP-1 в процессе роста гепатомы 22а у животных в тимоцитах и перитонеальных макрофагах — клетках, удаленных от места развития основной опухоли. Мышам С3НА подкожно инокулировали $2 \cdot 10^5$ жизнеспособных клеток гепатомы 22а и исследовали тимоциты, строму тимуса и клетки перитонеального экссудата на 3, 7, 14, 21, 28 и 35-е сут опухолевого роста. Тимоциты отделяли от стромы путем раздавливания и пропускания через нейлоновый фильтр. Экспрессию мРНК TSP-1 в клетках определяли с помощью реакции обратной транскрипции (ОТ) с последующей ПЦР. Суммарную РНК в количестве 2 мкг использовали для ОТ, которую проводили в присутствии олиго(дТ)15-праймеров и обратной транскриптазы М-MLV (Promega) в соответствии с протоколом от производителя. Специфические праймеры подбирали таким образом, чтобы длина продукта при прохождении реакции на кДНК и ядерной ДНК была различной. Праймеры для TSP-1: прямой 5'-caaggagatgcctgtgacc-3' и обратный 5'-ctggaatcgctcgaaatcgg-3' (размер продукта 216 п. н.). Результаты визуализировали при помощи электрофореза в геле, окрашенном бромистым этидием, фотографировали и измеряли интенсивность свечения полос при помощи программы ScionImage. Результаты нормализовали по уровню мРНК β -актина и обрабатывали статистически. На 21-е и 28-е сут роста гепатомы происходило достоверное двукратное повышение экспрессии мРНК TSP-1 в тимоцитах (на 35-е сут тимоциты не исследовали, в связи с тем что опухолевый рост сопровождался выраженной инволюцией тимуса и число тимоцитов в органе значительно уменьшалось). В строме тимуса также отмечали усиление синтеза TSP-1 на поздних сроках и на 3-и и 7-е сут после инокуляции опухолевых клеток. На 28-е и 35-е сут отмечали усиление экспрессии мРНК в клетках перитонеального экссудата (5.06 ± 0.37 в контроле и 6.91 ± 0.64 у мышей с гепатомой на 28-е сут, $p < 0.05$; 4.50 ± 0.46 в контроле и 8.09 ± 1.02 на 35-е сут, $p < 0.01$). Таким образом, нами впервые показана системная активация синтеза TSP-1 в организме животных-опухоленосителей, проявляющаяся в повышенной экспрессии мРНК этого фактора в тимусе и перитонеальных макрофагах. При росте гепатомы, как и многих других опухолей человека и животных, развивается инволюция тимуса. Предполагают, что одним из механизмов этого процесса является усиленный выход незрелых тимоцитов на периферию. Это согласуется с данными о роли TSP-1 в регуляции адгезии и миграции Т-лимфоцитов, а возможно, также и транс-эндотелиальной миграции тимоцитов. Полученные нами данные об усилении синтеза этого фактора стромальными клетками тимуса и самими тимоцитами позволяют пред-

полагать участие TSP-1 в усилении выхода тимоцитов на периферию. Резидентные тканевые макрофаги, как считается, из перитонеальной полости не мигрируют, и повышенный синтез TSP-1 в них, возможно, направлен на связывание продуктов опухолевого распада или это является их закономерной реакцией на длительно персистирующий в организме очаг неоплазии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-48250).

ВОЗДЕЙСТВИЕ АЛЬФА-ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТЫ НА КЛЕТКИ ЭПИДЕРМОИДНОЙ КАРЦИНОМЫ A431.

© О. П. Кисурин-Евгеньева,¹ А. В. Тишкова,¹ Е. А. Александрова,² Г. Е. Онищенко.¹ ¹ Биологический факультет Московского государственного университета и ² ГУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза РАМН, Москва.

Антиоксиданты представляют собой природные соединения, препятствующие образованию в клетках активных форм кислорода, что снижает риск развития различных заболеваний, в том числе возникновения опухолей. Антиоксиданты могут влиять на пролиферативную активность клеток, активировать программу апоптоза (прежде всего в трансформированных клетках). Однако для большинства антиоксидантов практически не проводилось комплексных исследований, включающих в себя анализ пролиферации, морфологии и ультраструктуры клеток. В работе исследовали влияние одного из широко используемых антиоксидантов — альфа-липоевой кислоты — на динамику клеточного цикла клеток эпидермоидной карциномы A431. Проведен также анализ ультраструктуры клеток. Методом проточной цитофлуориметрии показано, что кратковременное (14 ч, 200 мкМ) воздействие альфа-липоевой кислоты приводит к увеличению в популяции доли клеток в S- и G₂ + M-стадиях (замедление прохождения данных фаз клеточного цикла). При более длительном воздействии наблюдается сначала исчезновение пика G₂ + M (24 ч, 200 и 300 мкМ), а затем и пика G₁ (48 ч, 300 мкМ), что может свидетельствовать об элиминации клеток в этих фазах клеточного цикла. Анализ митотического индекса показывает, что полной остановки в прохождении клеточного цикла в присутствии альфа-липоевой кислоты не происходит ни при одном из вариантов воздействия. Культура A431 характеризуется наличием клеток с полиморфными ядрами (микроядра, ядра с инвагинациями, гигантские ядра), что отражает генетическую нестабильность трансформированных клеток. Длительное воздействие (48 ч, 300 мкМ) приводит к увеличению как числа полиморфноядерных клеток, так и числа патологических митозов. При воздействии более низкой дозы (24 ч, 200 мкМ) наблюдается значительное уменьшение доли таких клеток. Уменьшается также доля патологических митозов. Возможно, что данные проточной цитофлуориметрии (24 и 48 ч, 200 мкМ) отражают элиминацию прежде всего популяции полиморфноядерных клеток. Влияние альфа-липоевой кислоты на динамику клеточного цикла, изменение числа полиморфноядерных клеток и патологических митозов полностью обратимо. Ультраструктурный анализ показал, что в контроле область клеточного центра в клетках культуры A431 характеризуется наличием мно-

гочисленных везикул, окружающих центриоли. Хорошо развитый аппарат Гольджи формирует протяженные плоские диктиосомы, занимающие значительное пространство клетки. Многочисленные митохондрии с просветленным матриксом образуют кластеры в цитоплазме. При воздействии альфа-липоевой кислотой (48 ч, 200 мкМ) происходит набухание цистерн и везикул дистального отдела аппарата Гольджи, увеличивается содержание в клетке лизосом и миелоноподобных телец. Изменения структуры и расположения митохондрий при этом не происходит. Прижизненное окрашивание митохондрий Родамином 123 подтверждает данные электронной микроскопии о том, что в присутствии альфа-липоевой кислоты (48 ч, 200 мкМ) организация хондриома не изменяется. В целом воздействие альфа-липоевой кислоты (200 мкМ) на клетки эпидермоидной карциномы A431 приводит к замедлению (но не блокированию) прохождения клеточного цикла и элиминации клеток с полиморфными ядрами. При этом наблюдается значительное увеличение лизосомного компартмента.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 05-04-49248) и по проекту РНП 2.1.1.7842.

АНТИГЕННЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ МОЛЕКУЛ, УЧАСТВУЮЩИХ В ТРАНСЦИТОЗЕ СЕКРЕТОРНЫХ ИМУНОГЛОБУЛИНОВ (Ig). © В. Б. Климович, И. В. Грязева, М. П. Самойлович, М. С. Писарева, Д. Г. Ибрагимова. Центральный научно-исследовательский рентгенорадиологический институт, Санкт-Петербург.

Секреторные Ig (sIgA и sIgM) являются уникальными комплексами, в которых объединены продукты синтеза лимфоидных и эпителиальных клеток. Плазматические клетки лимфоидных тканей, ассоциированных со слизистыми, наряду с легкими и тяжелыми цепями Ig продуцируют J-цепи (130 остатков аминокислот), обеспечивающие сборку димеров IgA и пентамерных молекул IgM. J-цепи также участвуют во взаимодействии полимерных Ig с рецептором (pIgR) на базолатеральных поверхностях эпителиальных клеток. Комплексы pIgR с полимерными Ig перемещаются в трансцитозных вакуолях к апикальной мембране эпителиальных клеток. Под действием протеаз фрагмент pIgR, состоящий из 620 остатков аминокислот, утрачивает связь с мембраной и, присоединяясь к полимерным Ig, превращается в часть sIgA или sIgM, называемую секреторным компонентом (SC). В результате трансцитоза sIgA и sIgM оказываются на поверхности слизистых покровов, где выполняют многообразные функции защиты от патогенов и взаимодействия с нормальной микрофлорой. Созданные в лаборатории панели моноклональных антител (МКАТ) против компонентов sIgA и sIgM позволяют выявлять порознь и в различных сочетаниях все составляющие комплексов секреторных Ig человека. МКАТ против IgA распознают на альфа-цепях 8 антигенных детерминант. МКАТ против IgM выявляют 2 эпитопа мю-цепей. МКАТ против SC выявляют 10 эпитопов, из которых 4 экспонированы только на свободном SC, остальные сохраняются после включения SC в состав sIgA или sIgM. Получена панель МКАТ, распознающих несколько антигенных детерминант J-цепи. Созданы также МКАТ про-

тив свободных и связанных с Ig легких цепей каппа- и лямбда-типов. Исследование перекрестной реактивности МКАТ с sIgA и sIgM млекопитающих показало, что молекулы sIgA, SC и J-цепи человека и животных обладают рядом общих эпитопов. Совокупность полученных МКАТ представляет собой уникальный арсенал инструментов, позволяющих выявлять, выделять и анализировать молекулы sIgA и sIgM, SC и J-цепи, изучать их синтез и транспорт на ряде экспериментальных моделей *in vivo*, а также на культивируемых клетках человека и животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-48860).

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ПРОМОТОРНОЙ СТАДИИ КАНЦЕРОГЕНЕЗА. © В. А. Кобляков, М. С. Волков, А. В. Гаспарян, В. А. Евтеев, Н. А. Болотина. ГУ Российский онкологический научный центр РАМН, Москва, kobliakov@rambler.ru.

При действии канцерогенных веществ наследуемые изменения в геноме, определяющие опухолевый генотип, происходят на стадии инициации. При негенотоксическом влиянии на стадии промоции инициированные клетки получают преимущественный рост, назначение которого — создать условия для избирательного роста инициированных клеток. Предполагается, что именно стадия промоции является «узким» местом развития опухолевого процесса. С использованием различных экспериментальных моделей показано, что стадия промоции может реализоваться по различным механизмам в зависимости от действующего вещества. Можно выделить следующие группы воздействия. 1. Вещества, генерирующие образование активных форм кислорода (АФК), которые и являются истинными промоторами канцерогенеза, стимулируя пролиферацию, блокируя апоптоз и нарушая межклеточные коммуникации, что ограждает инициированные клетки от регуляторного воздействия нормальных клеток; к таким соединениям относятся фтороловые эфиры, антралин, а также процесс хронического воспаления. 2. Вещества, ингибирующие ферменты, прерывающие передачу митотического сигнала, в первую очередь фосфатазы; к таким соединениям относится оадаиковая кислота. 3. Соединения, стимулирующие метилирование ДНК, что приводит к «молчанию» метилированных генов. В случае генов-супрессоров отсутствие их экспрессии стимулирует пролиферацию инициированных клеток; к такому типу соединений относится фенотарбитал. 4. Соединения, активирующие ряд рецепторов, приводящие к изменению гомеостаза клетки. Активация рецептора PPAR (например, клофибратом) стимулирует синтез пероксисом — органелл, в которых находятся ферменты бета-окисления жирных кислот, — и вызывает более интенсивное окисление жирных кислот и увеличение уровня АФК, образующегося при этом ферментативном процессе. Хлорированные бифенилы, некоторые барбитураты, а также загрязнитель окружающей среды ДДТ, являющиеся промоторами канцерогенеза, взаимодействуют с рецепторами CAR, активация которого приводит, видимо, к промоции, по неизвестному механизму. В пользу этого говорит то, что мыши, нокаутированные по гену *CAR*, не чувст-

вительны к промоторному действию лигандов CAR. Наиболее исследовано действие промоторов, являющихся лигандами Ah-рецептора. К этому типу веществ принадлежат большинство загрязнителей окружающей среды, таких как полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), хлорированные диоксины и ароматические амины. Активированный Ah-рецептор является транскрипционным фактором, вызывая индукцию ферментов метаболизма ксенобиотиков, в том числе изоформ цитохрома P450. Помимо этого, он взаимодействует с различными регуляторными белками (белок ретинобластомы, NF-κB), изменяя их функции и активируя белок src. По-видимому, эти свойства активированного Ah-рецептора могут играть роль в реализации промоторной программы канцерогенов типа ПАУ или диоксинов. Взаимодействие диоксинов с цитохромом P450 может привести к генерации АФК. Помимо этого, нами показано, что канцерогенные ПАУ типа бензо[а]пирена взаимодействуют с неизвестным компонентом в клетке, вызывая стимуляцию пролиферации, активацию NF-κB и ингибирование межклеточных щелевых контактов. В то же время транскрипционный фактор AP-1 активируется под действием бензо[а]пирена только в клетках, в которых наблюдается экспрессия Ah-рецептора. Эти эффекты являются необходимыми факторами промоции. Таким образом, механизм промоторного действия лигандов Ah-рецептора зависит от того, экспрессируют ли инициированные клетки Ah-рецептор и изоформы цитохрома P450. Обсуждается механизм промоции в клетках, экспрессирующих и не экспрессирующих Ah-рецептор.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-48350).

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ КОСТНОГО МОЗГА КРЫСЫ НА РАННИХ И ПОЗДНИХ ПАССАЖАХ. © М. Н. Кожевникова, О. В. Паюшина, А. С. Микаелян. Институт биологии развития РАН, Москва, arsmika-el@gmail.com.

Мезенхимные стромальные клетки (МСК), впервые обнаруженные в составе стромы кроветворных органов А. Я. Фриденштейном, обладают статусом полипотентных стволовых клеток. Они способны давать начало адипогенной, остеогенной и ряду других дифференцировок. Изучение механизмов самоподдержания и направленной дифференцировки является одним из приоритетных направлений в биологии стволовых клеток. Известно, что мультипотентные свойства МСК при длительном культивировании ослабевают. Однако молекулярно-цитологические аспекты изменения мультипотентного статуса МСК при их долговременном культивировании изучены недостаточно для более полного суждения о роли многократного пассирования в процессах старения культуры МСК. Целью настоящей работы явился сравнительный анализ культур МСК на ранних и поздних сроках культивирования с применением цитологических методов в сочетании с ПЦР-анализом. Были использованы культуры МСК из костного мозга половозрелых крыс Вистар. Общая продолжительность культивирования составила более 140 сут, в течение которых культура претерпела 11

пассажей. По данным литературы, подобная культура относится к поздней. МСК инкубировали в индукционных средах в течение 14—18 сут. Гистохимический анализ остеогенной дифференцировки МСК при окрашивании культуры ализариновым красным S выявляет участки отложения кальция во внеклеточном матриксе как на ранних сроках культивирования (1—4-й пассажи), так и на поздних сроках (9-й и 11-й пассажи). В культурах 1—4-го пассажей минерализация внеклеточного матрикса осуществляется клетками полигональной формы — остеобластами, тогда как в культуре 9—11-го пассажей в участках отложения кальция обнаруживаются веретеновидные клетки, а типичные остеобласты отсутствуют. Судя по морфологическим признакам, происходит изменение типичной остеогенной дифференцировки, свойственной ранним пассажирам МСК. С помощью ПЦР-анализа, проводимого на мРНК, при инкубации МСК в остеогенной среде нами обнаружено значительное увеличение экспрессии специфичного для зрелых остеобластов маркера дифференцировки остеокальцина как на ранних, так и на поздних пассажах. Также выявлена экспрессия мастера гена остеогенной дифференцировки — фактора транскрипции *Runx2(cbfa-1)*. Иммуноцитохимически обнаружен коллаген 1-го типа в культурах МСК 2-го и 11-го пассажей. Полученные результаты свидетельствуют о реализации остеогенной дифференцировки в культуре МСК на поздних пассажах, несмотря на морфологически измененный характер этой культуры. Морфологический анализ адипогенной дифференцировки при окрашивании липидных включений клеток красителем Oil Red O выявил мультилокулярные адипоциты (одиночные или в виде кластеров) в культуре 1—4-го пассажей и отсутствие жировой дифференцировки в культуре 11-го пассажа. Таким образом, при продолжительном культивировании (11 пассажей) МСК из костного мозга крысы теряют свои потенции к адипогенной дифференцировке, при этом сохраняя способность к остеогенезу. Сравнительный анализ пролиферативного потенциала МСК на протяжении всего срока культивирования (более 140 сут) показал, что время удвоения популяции МСК на ранних пассажах составляет 2.8 сут, а на поздних пассажах — 3.6 сут, т. е. различия между ранними и поздними пассажами по времени удвоения незначительны. Вместе с тем на 5—6-м пассажах наблюдали «переломный момент», который заключался в практически полной остановке клеточного роста: в течение 35 сут культивирования число удвоения МСК составило всего 0.2. Данный феномен заслуживает дальнейшего изучения. В ходе прижизненной оценки состояния культуры МСК с помощью фазово-контрастной микроскопии обнаружено, что на ранних пассажах клеточная популяция гетерогенна и представлена по крайней мере клетками двух типов — крупных распластанных клеток и клеток фибробластоподобной формы. После многократного пассирования культура МСК становится более гомогенной и в ней преобладают клетки второго типа.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 06-04-48209) и по программе президента РАН «Молекулярная и клеточная биология».

МОРФОЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ КЛЕТОК *Danio rerio*. © Л. В. Козуко-

ва, С. А. Лохматова. Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных РАСХН, Санкт-Петербург—Пушкин, larkozik@list.ru.

Морфология и структура клеточного ядра во многом отражают функциональное состояние клетки, и воздействие разнообразных факторов на клетку может быть охарактеризовано определенными маркерами интерфазного ядра. Главными характеристиками развития клеток являются пролиферация, репарация, апоптоз и дифференцировка. Основными показателями в данной работе были выбраны митотический индекс, отражающий процесс пролиферации, и индекс пикнотических ядер, характеризующий конечную стадию апоптоза. Генетическую стабильность клеточной популяции эмбриональных клеток *Danio rerio* определяли путем анализа хромосом. Аквариумная рыбка *D. rerio* является одним из популярных модельных объектов исследования в биологии развития и генетики благодаря короткому генерационному периоду; кроме того, у *D. rerio* длительность стадий эмбрионального развития хорошо установлена и эмбрионы легко доступны для анализа благодаря прозрачным оболочкам. Для наших исследований была выбрана стадия 35 эмбрионального развития (30 сомитов, prim 5 — The Zebrafish book, 1995). Обработку материала проводили по методике Уолкера (Walker, 2000) в нашей модификации. После удаления оболочки зародышей на них воздействовали колхицином для получения метафазных хромосом. Было проанализировано под микроскопом более 2 тыс. эмбриональных клеток. Митотический индекс в разных сериях экспериментов варьировал от 2.55 до 3.15 %. Было подсчитано количество клеток с пикнотическими ядрами, которое варьировало от 1.7 до 2.4 %. Критериями пикнотических изменений в интерфазном ядре являлись округлые конденсированные фрагменты хроматина, а в митозе — слипшиеся сильно конденсированные хромосомы. Следовательно, на протяжении эмбрионального развития *D. rerio* происходит координация процессов активной пролиферации клеток и нарушений, а также гибели наследственного материала части эмбриональных клеток. После 1-часовой обработки эмбрионов на стадии бластулы (стадии 12—14) некоторыми мутагенами через 1 сут (стадия 35) был проведен морфоцитогенетический анализ клеток зародышей, который показал достоверное увеличение эмбриональных клеток с пикнотическими ядрами в 2—3 раза. Подтверждением мутагенного влияния некоторых веществ на генетический аппарат служил анализ хромосом. Диплоидное число хромосом у *D. rerio* составляет 50, количество плеч — 100. Кариограмма *D. rerio* характеризуется метацентрическими, субметацентрическими и акроцентрическими хромосомами. В экспериментах были выявлены только структурные нарушения, такие как делеции и фрагменты; геномных нарушений не наблюдали ни в контроле, ни в опытных группах. Пикнотические ядра являются конечным результатом апоптоза. Цитологически апоптоз проявляется в сжатии клеток, образовании мембранных пузырьков, конденсации и фрагментации хроматина, образовании апоптозных телец, что связано с дегенерацией актин-миозинового скелета (Croft et al., 2005). Апоптоз является физиологическим механизмом, устраняющим избыточные, или функционально аномальные, клетки, необходимые для нормального развития многоклеточного организма (Моргункова, 2005). Та-

ким образом, в тестах на цито- и генотоксичность исследованных химических веществ могут быть с успехом использованы такие показатели, как учет количества клеток с пикнотическими ядрами и индекс пролиферативной клеточной активности. Хромосомный анализ дает дополнительную информацию о характере геномной стабильности, его данные коррелируют с показателями пикнотических изменений ядер. Эти фенотипические особенности интерфазных ядер удобно использовать для оценки нарушений структурно-функциональной организации хромосом, что играет важную роль в экспериментальной биологии и клинических исследованиях.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА-МАРКЕРА СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК *Nvi-pl10* ПРИ МЕТАМОРФОЗЕ *Nereis virens* (Polychaeta, Annelida). © В. В. Козин, Р. П. Костюченко. Кафедра эмбриологии С.-Петербургского государственного университета, kostyuch@mail.ru.

Метаморфоз личинки и возникновение ювенильной формы — одно из ключевых событий в онтогенезе полихет. В ходе этого процесса создаются предпосылки для организации тела животного на весь постларвальный период. Вероятнее всего, при этом активируются новые программы функционирования и построения постларвального тела. Именно в этом смысле Петр Павлович Иванов понимал первичную гетерономность сегментов. Он показал (Iwanoff, 1928), что у некоторых видов *Serpullidae* и *Spionidae* во время метаморфоза клетки предпигидиальной зоны дедифференцируются и вступают в активный митотический цикл. Таким образом, по мнению Иванова, формируются предшественники зоны роста. В настоящей работе мы предприняли попытку оценить динамику экспрессии одного из генов стволовых клеток — гена *Nvi-pl10* — в области пигидия и предпигидиальной зоны роста, формирующихся в ходе личиночного развития и метаморфоза у беломорской полихеты *Nereis virens*. С этой целью методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с вырожденными праймерами к консервативной части гена, а затем и 3'RACE и 5'RACE ПЦР было произведено клонирование фрагментов гена *Nvi-pl10*, содержавших как 3'-, так и 5'-нетранслируемые зоны. Эти протяженные фрагменты были применены для последующей оценки экспрессии гена методами молекулярной гибридизации *in situ*. На стадии поздней метатрохофоры среди материала формирующихся пигидиальных лопастей, экспрессирующих ген *Nvi-pl10* на незначительном уровне, отмечены две группы клеток с очень высоким уровнем экспрессии. Эти домены, состоящие из нескольких клеток каждый, симметрично расположены в основании растущего пигидия, на его внешних латеральных сторонах. По мере формирования пигидия в ходе развития нектохеты сигнал ограничивается передней третью пигидиальных лопастей. Постепенно домены экспрессии расширяются на вентральную сторону, а позднее и на дорсальную, в конечном итоге формируя кольцо клеток покровного эпителия, экспрессирующих ген *Nvi-pl10* на высоком уровне. Ранее при проведении экспериментов с применением бромдезоксигуанидина (БДУ) на *N. virens* нами было показано (Габай, Костюченко, 2005), что в ходе метаморфоза, при переходе к постларвальному развитию, зона меченных БДУ клеток появляется в передней трети пигидия. Вероятнее всего, именно эти клетки составят зону роста и будут служить

источником клеточного материала для последующего формирования постларвальных сегментов. И действительно, на завершающей стадии метаморфоза нектохеты экспрессии в наружном эпителии предпигидиальной зоны сильный сигнал гена *Nvi-pl10* обнаружен во внутренних тканях, предположительно во вновь формирующейся мезодерме зоны роста и новых сегментов. Такой характер экспрессии сохраняется и в ювенильных червях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-49030-а).

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ МУТАЦИЙ *SuUR* И *Su(var)3-9* НА ВРЕМЕННУЮ КАРТИНУ РЕПЛИКАЦИИ В ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМАХ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ *Drosophila melanogaster*. © Т. Д. Колесникова, Д. А. Ткач, Д. Е. Коряков, Л. В. Болдырева, Е. Н. Андреева, О. В. Демакова, С. А. Демаков, И. Ф. Жимулев. Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск.

До недавнего времени ген *SuUR* был единственным известным фактором, который существенно влияет на временную картину репликации в политенных хромосомах ПХ слюнных желез *D. melanogaster*, не изменяя при этом длительности S-фазы. При мутации гена *SuUR* все районы интеркалярного гетерохроматина и некоторые прицентромерные районы ПХ заканчивают репликацию существенно раньше, чем в хромосомах личинок дикого типа. Недавно было показано, что гистонметилтрансфераза *SU(VAR)3-9* тоже оказывает влияние на паттерн репликации в прицентромерном гетерохроматине ПХ (Demakova et al. *Genetics*, 2007, **175**: 609—620). При этом у двойных мутантов *SuUR Su(var)3-9⁰⁶*, по-видимому, наблюдается аддитивный эффект. В настоящей работе мы пытались выявить районы ПХ, репликация которых находится под контролем этих генов. Предварительные данные о составе районов, политенизовавшихся у мутантов, мы получили при картировании отдельных гетерохроматиновых последовательностей ДНК при помощи гибридизации *in situ*. Эти данные позволили установить соответствие между морфологически выявляемыми в ПХ районами и картой митотического гетерохроматина и понять, какие блоки гетерохроматина подвержены влиянию *SuUR* и *Su(var)3-9⁰⁶*. Однако такое картирование дает недостаточно высокое разрешение. Например, ген *rpl15* и сателлит из семейства 1688 н. п., несмотря на то что они локализовались у мутантов в дисковой области ПХ, были картированы в одном диске. Для количественного определения политенизации различных районов прицентромерного гетерохроматина мы использовали метод Саузерн-блот-гибридизации, позволяющий точно определить степень политенизации отдельных последовательностей ДНК. В качестве зондов было выбрано 11 фрагментов ДНК из районов прицентромерного гетерохроматина разных хромосом, расположение которых на цитологической карте было уже известно. Мы обнаружили, что уровень недорепликации этих последовательностей по-разному зависит как от дозы гена *SuUR*, так и от мутации *Su(var)3-9⁰⁶*. Использование импульсного включения J-дезоксигуанидина (аналога дезокситимидина) позволило с высоким разрешением прокартировать участки наиболее поздней репликации в районах прицент-

ромерного гетерохроматина у мутантов *SuUR* и *Su(var)3-9⁰⁶*. Кроме того, при помощи этого метода удалось выявить район дополнительной политемизации в хромосоме 4 мутантов *Su(var)3-9⁰⁶* и *SuUR* и *Su(var)3-9⁰⁶*. У *SuUR Su(var)3-9⁰⁶* район 102D вступает в репликацию в конце S-фазы и продолжает реплицироваться даже тогда, когда все остальные районы хромосом (за исключением двух небольших зон в прицентромерном гетерохроматине) уже выходят из репликации. В результате соответствующий материал дает протяженный блок, существенно увеличивающий длину хромосомы 4.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 06-04-48387-а), президиумом РАН по программе 10.1 «Молекулярная и клеточная биология», СО РАН по Междисциплинарному интеграционному проекту (грант № 45), в виде гранта президента РФ (грант МК-540.2007.4) и президиумом РАН по программе поддержки ведущих научных школ РФ (грант НШ-942.2006.4).

ВИДОСПЕЦИФИЧНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПАХИТЕННОГО АРЕСТА У САМЦОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ И ЧЕЛОВЕКА. © О. Л. Коломиец. Институт общей генетики РАН, Москва.

Исследование механизмов мейотической селекции половых клеток актуально для решения вопросов нарушения репродукции человека и животных, фертильности гибридов, эволюции и становления видов. Давно известно, что нарушение синапсиса аутосом в мейозе гетерозиготных самцов млекопитающих приводит к ассоциации асинаптических участков аутосом с X-хромосомой. В таких случаях нарушается формирование структуры «полового тельца». Половой бивалент (X, Y) не выселяется на периферию ядра. Такие сперматоциты прекращают дифференцировку на стадии пахитены — происходит пахитенный арест сперматоцитов I порядка. В 1980-е годы Форейт предположил гипотезу, согласно которой пусковым механизмом пахитенного ареста у самцов млекопитающих с нарушением синапсиса хромосом является активация X-хромосомы, которая в норме инактивирована (Forejt et al., 1981; Forejt, 1982). В последние годы, когда к решению проблем нарушения фертильности человека и животных были привлечены новые методы клеточной биологии и молекулярной биологии, гипотеза, предложенная Форейтом, подверглась ревизии. Новая гипотеза объясняет механизм пахитенного ареста у самцов не активацией, а инактивацией X-хромосомы. Более того, согласно новой гипотезе, при ассоциации аутосомы с половым бивалентом инактивируются и асинаптические участки аутосом. Морфологически это выражается в уплотнении структуры осевых элементов полового бивалента и ассоциированных с ним аутосом. Обширная инактивация хромосом, согласно новой концепции, может восприниматься клеткой как потеря части генома, что приводит к включению механизма пахитенного ареста (Oliver-Bonet et al., 2005). В основе этой гипотезы лежат данные о формировании белкового «покрывала», изолирующего половой бивалент от аутосом в профазе I мейоза. При электронно-микроскопическом исследовании распластанных синаптонемных комплексов (СК) нами выявлены видоспецифичные особенности поведе-

ния половых хромосом и аутосом в норме и при развитии событий, приводящих к мейотической стерильности у человека и представителей разных видов млекопитающих. Полученные результаты позволяют предполагать, что специфические особенности структуры и поведения половых хромосом в мейозе предков могли сыграть решающую роль в становлении отдельных видов. Установлено, что у пациентов с пониженной фертильностью и блоком сперматогенеза на стадии пахитены морфологические признаки «пахитенного ареста» универсальны. Признаки пахитенного ареста выявлены не только при нарушениях гомологии и частичном асинапсисе аутосом, но и у пациентов, у которых причина нарушения фертильности обусловлена аутоиммунными и инфекционными процессами тестикул.

УЧАСТИЕ С-КОНЦЕВОГО ДОМЕНА РЕЦЕПТОРА ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА (ЭФР) В РЕГУЛЯЦИИ УБИКВИТИНИРОВАНИЯ РЕЦЕПТОРА. © К. А. Кондратов,¹ А. Л. Чернорудский,¹ А. П. Амосова,¹ Е. С. Корнилова.¹ ¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и ² Нижегородский государственный университет.

Рецептор эпидермального фактора роста (ЭФР-Р) является одним из важнейших участников передачи сигнала внутрь клетки. Цитоплазматическая часть молекулы этого трансмембранного белка содержит три морфофункциональных домена — подмембранный домен, тирозинкиназный домен и С-концевой домен. В С-концевом домене находится несколько сайтов автофосфорилирования, важных для связывания с внутриклеточными эффекторами рецептора. Негативная регуляция работы ЭФР-Р осуществляется за счет ЭФР-стимулируемого эндцитоза и последующей деградации в лизосомах. Известно, что этот процесс регулируется убиквитинированием рецептора убиквитинлигазой с-Cbl. Убиквитинирование ЭФР-Р является результатом стимуляции его тирозинкиназной активности при связывании с ЭФР. По последним данным, модификации подвергаются множественные остатки лизина, расположенные в тирозинкиназном домене рецептора. Убиквитинлигаза может взаимодействовать с ЭФР-Р двумя способами. В первом случае с-Cbl непосредственно связывается с фосфорилированным остатком тирозина рецептора в положении 1045 (Y1045). Во втором случае с-Cbl взаимодействует с рецептором через адаптерный белок Grb2, который в свою очередь может связываться с тремя сайтами фосфорилирования на С-концевом домене рецептора (Y1068, Y1086 и Y1101). Физиологическое значение каждого из этих способов связывания неясно. В данной работе было исследовано влияние С-концевого домена на убиквитинирование ЭФР-Р после активации его ЭФР. В качестве модели использовали панель клеточных линий NIH 3T3, экспрессирующих нативный рецептор (WT), рецептор, лишенный тирозинкиназной активности (K721), и рецепторы с делециями 63, 123 или 165 С-концевых аминокислот (CD63, CD123 и CD165 соответственно). Рецепторы без 165 аминокислотных остатков (АО) лишены всех четырех связывающих сайтов для с-Cbl, рецепторы без 123 АО имеют лишь сайт прямого связывания Y1045, тогда как рецептор без 63 АО, так же как и нативный рецептор, содержал все четыре сайта связывания с-Cbl. Иммунобиохимический анализ показал, что убиквитинирование

рецептора не происходит как в клетках K721, так и в клетках CD165. В то же время в клетках CD123 ЭФР-Р убиквитинировался, но в значительно меньшей степени, чем в клетках CD63 и WT. Субклеточное фракционирование в градиенте Перколла показало, что степень убиквитинирования рецептора коррелирует с эффективностью перехода ЭФР-Р из ранних эндосом в поздние. Динамика убиквитинирования и спектр модифицированных форм мутантных рецепторов также различались. Подобные различия были выявлены также и при сравнении формы убиквитинирования ЭФР-Р в клетках CD63 и WT, хотя эти две рецепторные формы имеют полный набор сайтов связывания с-Cbl и различаются лишь С-терминальным участком. Наши данные позволяют предполагать, что сайты непрямого связывания убиквитинлигазы с ЭФР-Р существенны для достижения высокой степени модифицированности рецептора, а его С-концевой домен длиной в 63 АО играет важную роль в модуляции степени убиквитинирования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-49046).

ИЗМЕНЕНИЕ ПОПУЛЯЦИИ NeuN-ПОЗИТИВНЫХ НЕЙРОНОВ ОБЛАСТИ СА1 ГИППОКАМПА КРЫСЫ ПОСЛЕ ТРАНЗИТОРНОЙ ОБЩЕЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА. © Д. Э. Коржевский,¹ М. В. Ленцман,² О. В. Кирик.¹ ¹ Отдел морфологии Института экспериментальной медицины РАМН, iemmorphol@yandex.ru, и ² Институт физиологии РАН, Санкт-Петербург.

Известно, что развитие восстановительных процессов после ишемического повреждения головного мозга сопровождается активацией эндогенных нейральных стволовых клеток, однако до настоящего времени остается неизученным вопрос о принципиальной возможности полноценного восстановления утраченных нейронных популяций головного мозга млекопитающих с помощью собственных резервов нейральных стволовых клеток. В предыдущих исследованиях нами было показано, что индукция транзиторной общей ишемии головного мозга у крыс в соответствии с двухсосудистой моделью приводит к избирательной субтотальной гибели пирамидных нейронов области гиппокампа СА1 при сохранении нейронов областей СА3 и СА4. Цель настоящего исследования состояла в изучении изменения популяции нейронов гиппокампа через 1, 2 и 7 нед после ишемического повреждения с помощью селективного нейронального маркера NeuN, позволяющего идентифицировать как крупные пирамидные нейроны гиппокампа, так и мелкие нейроны, выявление которых при использовании классических нейроморфологических подходов затруднительно. С целью получения стандартизированного ишемического повреждения гиппокампа применяли двухсосудистую модель (Smith et al. *Acta neuropathol. Scand.*, 1984. 69: 385—401). Иммуноцитохимическое выявление ядерного нейронального маркера NeuN проводили на парафиновых срезах, полученных на ротационном микротоме, в соответствии с опубликованным ранее протоколом (Коржевский и др. *Морфология*, 2005, 128(5): 76—78). Установлено, что через 1 нед после ишемического повреждения число нейронов, приходящихся на 100 мкм пирамидного слоя, уменьшается с 12.6 ± 1.7

до 1.25 ± 0.44 . В дальнейшем увеличения числа пирамидных нейронов в зоне СА1 не происходило ни у одного из исследованных животных; напротив, к 7-й нед после ишемии среднее число NeuN-позитивных клеток уменьшалось до 1 на 300 мкм протяженности пирамидного слоя. Таким образом, несмотря на активацию нестин-иммунопозитивных и пролиферирующих эндогенных клеток-предшественников в гиппокампе крысы в отдаленные сроки после транзиторной ишемии головного мозга, популяция пирамидных нейронов гиппокампа не восстанавливается. Этот факт свидетельствует в пользу принципиальной неспособности активированных эндогенных нейральных стволовых клеток (и клеток-предшественников) адекватно восполнять утраченные нейронные популяции даже при сохранении ламинарной организации поврежденной структуры мозга.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 05-04-492397 и 05-04-08072-офи).

ЯДЕРНЫЙ АНТИГЕН КЛЕТОЧНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ В ЛИМФОЦИТАХ КОРОВ С ВИРУСИНДУЦИРОВАННЫМ ЛЕЙКОЗОМ. © Г. П. Косякова,¹ С. Н. Прошин,² В. Ю. Кравцов,² А. Ф. Яковлев.¹ ¹ Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных и ² Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины МЧС России, Санкт-Петербург, psn@arcserm.spb.ru.

При лейкозе у коров, вызываемом вирусом типа С (подсемейство Oncovirinae, семейство Retroviridae), характерной особенностью является развитие персистентного В-лимфоцитоза, который может сохраняться на протяжении нескольких лет. Предполагается, что в условиях *in vivo* (т. е. в циркулирующей крови) пролиферативная активность лимфоцитов существенно снижена за счет повышенного образования антител к ряду белков вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС), образующихся в организме пораженного животного. Ядерный антиген клеточной пролиферации (ЯАКП) — белок с мол. массой 36 кДа, экспрессирующийся в G₁- и S-фазах клеточного цикла, нашел широкое применение для верификации интерфазных клеток, обладающих пролиферативным потенциалом. В работе были исследованы лимфоциты периферической крови здоровых коров и коров, пораженных ВЛКРС. Иммуноцитохимический анализ на ядерный антиген клеточной пролиферации показал, что в среднем частота клеток, положительных на иммуноцитохимическое окрашивание в группе здоровых коров, составила 6.2 %, тогда как в группе животных с вирусносительством частота клеток, положительных в иммуноцитохимической реакции, достигала 63.4 % (U-критерий Вилкоксона—Манна—Уитни, $0.005 < P_u < 0.001$). На основе иммуноцитохимического анализа сделан вывод о достоверном различии в пролиферативном статусе лимфоцитов здоровых коров и коров-вирусоносителей и информативности иммуноцитохимического метода в исследовании лейкоза крупного рогатого скота.

АНАЛИЗ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК В ЦЕНТРОМЕРНЫХ РАЙОНАХ ХРОМОСОМ ПТИЦ МЕТОДАМИ IN SILICO. © А. В. Красикова, С. Е. Дерюшева,

Е. Р. Гагинская. Биологический научно-исследовательский институт С.-Петербургского государственного университета, chromas@paloma.spbu.ru.

Геном домашней курицы *Gallus gallus domesticus* — первый среди секвенированных геномов птиц (ICGSC, 2004). Несмотря на прогресс в исследовании генома курицы и успешное выполнение проекта по полному секвенированию генома, сложности, связанные с клонированием, секвенированием, «сборкой» в суперконтиги и «привязкой» к хромосомам повторяющихся последовательностей ДНК, организованных в тандемные массивы, приводят к появлению брешей в упорядоченных секвенированных последовательностях хромосом. Поэтому даже в законченных проектах секвенированных геномов практически отсутствует информация о таких районах хромосом, как центромеры и теломеры, а также о некоторых кодирующих участках, как, например, кластеры генов рНК (<http://www.ensembl.org>; <http://www.ncbi.nih.gov>). В текущей версии генома курицы центромерные районы хромосом обозначены пропусками, длина которых принята за 1.5 млн п. н. для макрохромосом и 0.5 млн п. н. для микрохромосом (ICGSC, 2004; Supplementary). Для определения положения центромер в упорядоченных секвенированных последовательностях хромосом используется следующая информация: значения центромерных индексов хромосом, данные FISH-анализа и наличие в контигах повторяющихся последовательностей. Мы провели компьютерный анализ последовательностей, граничащих с центромерными районами, в секвенированных последовательностях хромосом курицы. Этот подход позволил выявить как ранее известные сателлитные последовательности, так и новые повторы. В частности, на хромосоме 24 был обнаружен GC-богатый тандемный повтор с повторяющейся единицей длиной 28 п. н., который мы назвали PO28. ПЦР-анализ геномной ДНК курицы с использованием праймеров, специфичных к последовательности PO28, подтвердил наличие этого повтора в геноме курицы и его тандемную организацию. Результаты компьютерного анализа локализации повтора PO28 в геноме курицы при помощи программы BLAST позволяют ожидать его присутствие в прицентромерных районах как макро-, так и микрохромосом и близкую локализацию к повторам CNM и PO41. Секвенированные последовательности, организованные в суперконтиги, но не имеющие никаких маркеров, позволяющих привязать их к определенной хромосоме, помещены на так называемую виртуальную хромосому (chromosome unknown, chrUn). ChrUn курицы содержит последовательности ДНК некоторых микрохромосом, а также повторяющуюся ДНК (ICGSC, 2004). Ранее мы показали транскрипцию некодирующих прицентромерных и субтеломерных сателлитов, в частности повторов CNM и PO41, в ооцитах курицы (Deryusheva et al., 2006; Kraskova et al., 2006). Однако механизмы, регулирующие транскрипцию сателлитных повторов, во многом остаются неясными. Мы провели компьютерный анализ доступных в базе данных генома курицы клонов, содержащих сателлитные повторы CNM и PO41 (всего 107 контигов из chrUn), при помощи программы RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org>). Помимо контигов, содержащих только кластеры повторов CNM и PO41 или переходы друг в друга массивов PO41 и CNM, было обнаружено 9 контигов, содержащих регуляторные промоторные последовательности. Сравнение этих последовательно-

стей с имеющимися в базе данных RepBase Update (<http://www.girinst.org>) показало их принадлежность группе интерсперсных повторов, а именно LTR-содержащих ретротранспозонов. Среди этих ретротранспозонов были обнаружены элементы, содержащие транскрипционно активные промоторные последовательности, например эндогенный ретровирус (ERV) курицы с необычно короткими LTR длиной 243 н. п. (Boyce-Jacino et al., 1989). Следует отметить, что, помимо генов pol ERV, других открытых рамок считывания в контигах, содержащих сателлиты CNM и PO41, обнаружено не было. Эти данные позволяют предполагать, что транскрипция сателлитных повторов в ооцитах курицы может инициироваться на TATA-бокссодержащих промоторных последовательностях, локализованных в 3'- или 5'-LTRs ретротранспозонов, прилежащих к сателлитам.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-48252).

ЦЕНТРОМЕРНЫЕ РАЙОНЫ ХРОМОСОМ И ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОМА В РАСТУЩИХ ООЦИТАХ. © А. В. Красикова, С. Е. Дерюшева, А. Ф. Сайфитдинова, Е. Г. Гагинская. Биологический научно-исследовательский институт С.-Петербургского государственного университета, chromas@paloma.spbu.ru.

Известно, что центромерные районы хромосом выполняют важную функцию в архитектуре геномов соматических и нервных клеток. Способность образовывать хромоцентры и неслучайная их локализация внутри интерфазного ядра — типичные особенности центромерного гетерохроматина, причем положение центромерных районов и образованных ими хромоцентров внутри ядра определяется типом ткани и стадией клеточного цикла. В оогенезе функция центромерных районов хромосом и их роль в пространственной организации генома изучены недостаточно. В вителлогенных ооцитах позвоночных стадия транскрипционно активных хромосом сменяется глобальной инактивацией генома, которая сопровождается масштабными изменениями не только структуры хромосом и экстрахромосомных доменов, но также изменениями архитектуры ядра и формированием кариосферы (Gruzova, Parfenov, 1993). Механизм этих изменений нуждается в дальнейших исследованиях. Ядра растущих ооцитов птиц представляют собой удобную и перспективную модельную систему для подобных исследований благодаря специфическому типу оогенеза у птиц, при котором в ооците отсутствуют хромосомные и амплифицированные ядрышки и очень малочисленные экстрахромосомные внутриядерные тельца. В докладе приведены результаты исследования функциональной морфологии и динамики центромерных нейронов хромосом птиц на стадии ламповых щеток и в ходе образования кариосферы, выполненного с использованием методов иммунофлуоресценции, флуоресцентной гибридизации *in situ*, иммуноблотинга и компьютерного анализа. Анализируя строение центромер на стадии ламповых щеток, мы основывались на известных данных об особенностях структурной организации центромерных районов эукариотических хромосом и существования в составе центромеры функциональных доменов. Основные

домены центромерного района (домен контакта, содержащий прицентромерный гетерохроматин, центральный, содержащий центромерный гетерохроматин, и кинетохорный) были нами идентифицированы в структуре ламповых щеток, особенности их состава, морфологии и функционирования были изучены. В прицентромерном гетерохроматине выявлены эпигенетические маркеры транскрипционного инертного хроматина (белок HP1 β и метилированный цитозин), в то же время в нем обнаружена транскрипция некодирующей сателлитной ДНК. Белковые тела (БТ), которые содержат белки, участвующие в поддержании структуры хромосом (ДНК-топиомеразу II, элементы комплекса когезии сестринских хроматид и синаптонемного комплекса), формируются в ассоциации с центральным доменом центромеры. В созревающих ооцитах центромеры и ассоциированные с ними БТ проявляют специфическую функцию, связанную с топологической организацией хромосом в процессе формирования кариосферы: сливающиеся БТ образуют белковый остов кариосферы, конденсированные хромосомы располагаются на его поверхности, будучи «заякорены» в материал остова кариосферы центромерными районами. Важная функция остова кариосферы, по-видимому, заключается также в создании депо белков, которые могут быть вовлечены в топологическую организацию инактивированного генома на ранних стадиях эмбриогенеза. Наше исследование и имеющиеся в литературе данные позволяют сделать вывод о том, что БТ образуются на хромосомах стадии ламповых щеток у животных, принадлежащих к разным систематическим группам. В докладе обсуждаются универсальность и распространенность этого типа внутриядерных структур.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-48252).

ФЕНОТИП ГИБРИДНЫХ КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ СЛИЯНИИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК И ТЕТРАПЛОИДНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ.
© А. А. Круглова, М. М. Грдина, Н. М. Матвеева, О. Л. Серов. Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, kruglova@ngs.ru.

Гибридные клетки, полученные в результате слияния плюрипотентных эмбриональных стволовых (ЭС) и соматических клеток, являются удобной моделью для изучения фундаментальных проблем биологии развития — плюрипотентности и возможности обратимости дифференцировки генома соматической клетки. Гибридные клетки такого типа проявляют плюрипотентные свойства и фенотип, характерные для ЭС-клетки. Можно предположить, что при слиянии диплоидной ЭС-клетки и тетраплоидной соматической клетки гибридные клетки будут обладать свойствами и фенотипом соматического, а не плюрипотентного партнера. Целью данной работы явилось исследование влияния плоидности соматической клетки на фенотип гибридных клеток. В работе использовали серии клонов гибридных клеток от слияния ЭС-клеток линии E14Tg2aSc4TP6.3, полученной из внутренней клеточной массы бластоцисты мыши *Mus musculus* линии 129/Ola, со следующими соматическими партнерами: эмбриональными диплоидными и тетраплоидными фибробластами (серия клонов *tef* и *tef-1* гибридных

клеток соответственно) и фибробластами из взрослой мыши, полученными от мышей линии DD/c (серия клонов *taf*); эмбриональными диплоидными и тетраплоидными фибробластами, полученными от мышей линии C57Bl/1(1)1RK (серии клонов *tdf* и *tf* соответственно). Было обнаружено, что все клоны гибридных клеток серий *ttf* и *tef-t*, полученные при слиянии ЭС-клеток с тетраплоидными фибробластами, имели фенотип соматического партнера, т. е. фибробласта. Иммунофлуоресцентным методом показано, что коллаген и F-актин распределены в цитоплазме клеток клонов этой серии по тому же типу, что и в фибробластах. Однако клоны гибридных серий *tdf*, *fat* и *tef*, при получении которых в качестве соматического партнера использовали диплоидные фибробласты, имеют фенотип, типичный для плюрипотентного партнера, и количество клеток, экспрессирующих маркеры плюрипотентности Oct-4 и Nanog, в этих клонах сопоставимо с таковым в родительской линии плюрипотентных ЭС-клеток. Таким образом, мы впервые наблюдали доминирование фенотипа соматического партнера в гибридных клетках от слияния ЭС-клеток и соматических клеток. Можно предположить, что доминирование фенотипа соматического или плюрипотентного партнера является следствием сегрегации хромосом одного из партнеров. Был проведен ПЦР-анализ хромосомного состава с помощью полиморфных микросателлитов, позволяющих надежно маркировать и различать хромосомы обоих партнеров по слиянию. В клетках клонов, полученных при слиянии ЭС-клеток с тетраплоидными фибробластами и имеющими фенотип, типичный для соматического партнера, выявлена полная потеря обоих гомологов некоторых хромосом плюрипотентного партнера. В клетках клонов, полученных от слияния ЭС-клеток с диплоидными фибробластами и имеющими фенотип плюрипотентного партнера, методом ПЦР-анализа не обнаружено потери хромосом. Для выявления возможной потери гомологов некоторых хромосом было необходимо проанализировать их число. Подсчет хромосом показал, что в клонах, полученных при слиянии с диплоидными фибробластами, наблюдается частичная потеря гомологов некоторых хромосом. Таким образом, мы впервые наблюдали влияние плоидности соматического партнера на фенотип и сегрегацию хромосом плюрипотентного партнера в клонах гибридных клеток с фенотипом соматического партнера.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-00528) и СО РАН (интеграционные проекты 5.2.2 и 14.2).

МОРФОГЕНЕЗ IN VITRO КЛЕТОК КАЛЛУСОВ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ. © Н. Н. Круглова, О. А. Сельдимирова, А. А. Катасонова, Д. Ю. Зайцев. Институт биологии Уфимского НЦ РАН, Kruglova@anrb.ru.

Морфогенез растений как формообразовательный процесс различных структур, совершающийся на различных уровнях, вызывает большой интерес. Одно из перспективных направлений исследований — изучение морфогенеза в каллусе в контролируемых условиях *in vitro*. Каллус как гетерогенная интегрированная структура (система), образующаяся в результате пролиферации клеток на поверхности отдельных структур растительного орга-

низма, формирующаяся, как правило, из исходно разных клеток генеративных или вегетативных органов (Батыгина, 1987), представляет собой идеальную модельную систему для изучения как общих закономерностей, так и особенностей морфогенеза растений *in vitro*. Цель исследования состояла в выявлении путей морфогенеза *in vitro* клеток каллуса, различающихся по своему происхождению: каллуса, полученного в культуре *in vitro* незрелого пыльника, и каллуса, полученного в культуре *in vitro* незрелого зародыша. Объектом исследования послужили сорта и гибридные линии яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L., которые, согласно предварительным данным, отличаются высокой частотой формирования морфогенных каллусов в культуре незрелых пыльников и в культуре незрелых зародышей. Предварительно было выявлено, что компетентный к формированию морфогенного каллуса незрелый пыльник должен находиться в стадии сильновакуолизированной микроспоры (Круглова и др., 2005), незрелый зародыш — в фазе органогенеза (Круглова, Сельдимирова, 2004). Морфогенные каллусы различного происхождения получали путем культивирования *in vitro* незрелых пыльников и незрелых зародышей на индукционной питательной среде, составленной по прописи Мурашиге и Скуга (Murashige, Skoog, 1962), при этом незрелые пыльники и незрелые зародыши культивировали до появления на их поверхностях хорошо развитых морфогенных каллусов. Методами световой и просвечивающей электронной микроскопии установлено, что морфогенный каллус обоих типов состоит из групп неоднородных клеток — меристематических и паренхиматозных. В то же время морфогенный каллус пыльникового происхождения берет начало от одной гаплоидной клетки — сильновакуолизированной микроспоры, тогда как морфогенный каллус зародышевого происхождения — от группы диплоидных клеток щитка незрелого зародыша. Методом иммуноферментного анализа растительных образцов (Кудоярова и др., 1986) в морфогенных каллусах обоих типов выявили содержание эндогенного ауксина ИУК и перенесли их на среду для регенерации, составленную по прописи Мурашиге и Скуга, в вариантах, различающихся концентрацией экзогенного ауксина ИУК. Методами световой и просвечивающей электронной микроскопии через 30—35 сут культивирования были выявлены следующие пути морфогенеза меристематических клеток каллусов обоих типов: эмбриоидогенез (соматический эмбриогенез), гемморизогенез, геммогенез, ризогенез и гистогенез. Установлено, что определяющую роль в индукции того или иного пути морфогенеза играл баланс между эндогенным содержанием ИУК (в составе морфогенного каллуса в момент инокуляции на среду для регенерации) и концентрацией экзогенной ИУК (в составе среды для регенерации). Таким образом, индукция определенного пути морфогенеза меристематических клеток морфогенного каллуса обоих изученных типов определяется соотношением между эндогенным содержанием ауксина ИУК в каллусе (внутренний сигнал) и экзогенной концентрацией этого ауксина в питательной среде (внешний сигнал). По-видимому, сама способность инициальных клеток к морфогенезу в системе любого каллуса зависит от их расположения в каллусе и от межклеточных взаимодействий (позиционный контроль). В целом полученные на примере морфогенных каллусов различного происхождения (гаплоидная сильновакуолизированная микроспора пыльника и диплоидные клетки щитка не-

зрелого зародыша) экспериментальные данные подтверждают концепцию универсальности путей морфогенеза растений в естественных условиях и в условиях культуры *in vitro* (Батыгина, 1984, 1994, 2000).

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проекты 05-04-97911 и 05-04-08114), по программе «Ведущие научные школы РФ» (грант НШ-4834.2006.4) и по программе ГНТП АН РБ «Воспроизводство биоресурсного потенциала РБ» (грант 3/3).

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАЗМЕРА ГЕНОМА РАЗЛИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ЧЕЛОВЕКА.
© Б. Н. Кудрявцев,¹ Г. А. Сакута,¹ А. М. Калимагамбетов,² Н. Н. Безбородкина,¹ Ю. М. Розанов.¹ ¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и ² Казахский национальный университет, Алма-Ата, Республика Казахстан.

Клеточные культуры в значительной своей части имеют опухоловое происхождение. Характерной особенностью многих опухолевых клеток является нестабильность их генома. Перевод клеток в культуру и последующая их адаптация к постоянному существованию в условиях *in vitro* сопровождаются, по-видимому, еще большей разбалансировкой генома. Клетки в культуре, лишенные тех регуляторных воздействий, которым они подвергались в нормальном многоклеточном организме, в значительной степени теряют свои изначальные дифференцированные функции. Известно также, что большое количество клеток в культуре может быть получено из одной-единственной клетки. Фактически клетки в культуре представляют собой самостоятельные одноклеточные организмы, существующие и эволюционирующие в специфических условиях окружающей среды. Таким образом, клеточные культуры являются удобной биологической моделью для экспериментального изучения основных путей и направлений эволюции генома. Цель данной работы состояла в сравнении размера генома клеток человека, культивируемых длительное время в условиях *in vitro*, с размером генома клеток, полученных из тканей нормального человека. Сравнительный анализ содержания ДНК в клетках 40 различных клеточных линий человека, проведенный с помощью проточной цитометрии, показал, что размер генома клеток в культуре независимо от их происхождения увеличивается по сравнению с нормой. Показано, что размер генома клеток в различных клеточных линиях увеличивается пропорционально увеличению модального числа хромосом в кариотипе ($r = 0.984$, $P < 0.001$). В расчете на 46 хромосом увеличение содержания ДНК в различных клеточных линиях по сравнению с содержанием ДНК в геноме нормального человека составило примерно 5.53 %, или $400 \cdot 10^6$ пар оснований. В шести клеточных линиях, модальное число хромосом в кариотипе которых равнялось 46, увеличение размера генома составило в среднем 3.8 %, или $270 \cdot 10^6$ пар оснований. Избыточное количество ДНК в геноме неравномерно распределено по хромосомам в кариотипе клеточных линий и может изменяться в процессе длительного культивирования.

ВЛИЯНИЕ ПРОЛАКТИНА НА СТАТУС ХРОМАТИНА В ООЦИТ-КУМУЛЮСНЫХ КОМПЛЕКСАХ КОРОВ,

ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ Фолликулов разного диаметра при их созревании *in vitro*. © Т. И. Кузьмина,¹ Х. Альм,² Х. Торнер,² О. С. Скотти,¹ Т. В. Кибардина.¹ ¹ Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных РАСХН, Санкт-Петербург—Пушкин, и ² Институт биологии сельскохозяйственных животных, Думмерсторф—Росток, Германия, tkuzmina@rol.ru.

Важными моментами, определяющими судьбу ооцита при экстракорпоральном дозревании, являются состав культуральной среды и характер влияния биологических активных веществ, используемых в качестве добавок. Ранее нами обнаружено положительное влияние 50 нг/мл бычьего пролактина (БПРЛ) на развитие преимплантационных зародышей крупного рогатого скота, полученных путем экстракорпорального оплодотворения ооцитов фолликулов диаметром 3 мм (Kuzmina et al. Arch. Anim. Breed., 1996, 39: 54). Созревание яйцеклетки *in vitro* — комплексный процесс взаимодействия ооцита и окружающих его клеток кумулюса. Для уточнения путей реализации влияния пролактина на мейоз и доимплантационное развитие эмбрионов нами исследованы морфология ядер клеток кумулюса ооцитов, выделенных из фолликулов с различным диаметром, а также статус хроматина ооцитов при их экстракорпоральном культивировании. Все выделенные фолликулы классифицировали в соответствии с диаметром на три группы: группа 1 (диаметр 2—3 мм), группа 2 (диаметр 3—5 мм) и группа 3 (диаметр 5 мм и более). При оценке состояния хроматина в качестве контролируемого параметра использовали количество клеток кумулюса с пикнотическими ядрами. Фолликулы культивировали в среде ТС-199 (Sigma) с 20 % бычьей сыворотки. В опыте в среду добавляли 50 нг/мл БПРЛ (Институт химии гормонов, Москва). Цитогенетический анализ клеток кумулюса проводили методом Тарковского (Tarkowsky. Cytogenetic, 1966, 1). Дегенерированными считали ооцит-кумуляные комплексы (ОКК), содержащие более 20 % клеток кумулюса с пикнотическими ядрами. Всего проанализировано 237 000 клеток кумулюса от 216 ОКК. Наибольшая доля дегенерированных клеток обнаружена у ОКК, выделенных из фолликулов диаметром менее 3 мм, — 29.6 %, тогда как для фолликулов диаметром 3—5 и более 5 мм эти величины составляли 14.7 и 14.2 % соответственно ($P < 0.05$). В результате культивирования в течение 24 ч число ОКК с высоким уровнем пикнотических ядер в кумулюсных клетках возрастало во всех группах. При этом общая тенденция не изменилась: как в контрольной, так и в опытной группах наибольшее число пикнозов было отмечено в ОКК, выделенных из фолликулов диаметром менее 3 мм (в контроле — 36.6 %, в опыте — 30 %). Введение в культуральную среду БПРЛ позволило значительно снизить уровень пикнотических ядер в клетках кумулюса ОКК, выделенных из фолликулов диаметром 3—5 мм (в контроле — 25.0 %, в опыте — 5.7 %; $P < 0.01$). Во второй серии экспериментов проводили оценку статуса хроматина ооцитов на разных стадиях мейоза. Были исследованы 1673 ооцит-кумуляные комплексы. Большинство ооцитов имели дисперсный (54.2 %) или компактный (37.6 %) кумулюс в зависимости от размера фолликула. Конфигурация хроматина 400 проанализированных ооцитов также зависела от диаметра фолликула. После созревания фолликулов *in vitro* мы обнаружили различия в состоянии хроматина в метафазе II.

Доля созревших ооцитов распределилась по группам следующим образом: группа 1 — 77.3 %, группа 2 — 81.4, группа 3 — 64 %. Хроматин 61.8 % ооцитов группы 1 после 24 ч культивирования находился в метафазе II с экстрекцией полярного тельца, в то время как в группах 2 и 3 таких яйцеклеток было лишь 40.0 и 34.4 % соответственно ($P < 0.01$). Последний факт позволил нам сделать предположение о том, что спонтанное ядерное созревание ооцитов из фолликулов малого диаметра происходит быстрее. При оплодотворении ооцитов, выделенных из фолликулов диаметром больше 5 мм и созревших в средах с пролактином, обнаружены достоверные различия в количестве полученных эмбрионов на стадии бластоцисты (7-е сут) — 52.6 % при 25 % в контроле ($P < 0.05$).

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *Nit-caudal* В СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЗОНЫ РОСТА ПОЛИХЕТЫ *Nereis virens* В НОРМЕ И ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ. © М. А. Кулакова, Т. Ф. Андреева. Биологический научно-исследовательский институт С.-Петербургского государственного университета, alexanga@yandex.ru.

Регуляторные гены *ParaHox* семейства *Cad/Cdx*, кодирующие гомеодомен и содержащие транскрипционные факторы, традиционно рассматриваются в качестве эмбриональных позиционных спецификаторов задних отделов тела. Кроме того, экспрессия гена *caudal* в постериальной пресомитной мезодерме позвоночных (Deuterostomia) и в субтерминальной зоне роста артропод (Ecdysozoa) имеет большое значение для элонгации и метамеризации (сегментации и сомитогенеза) туловищных отделов у животных этих эволюционных ветвей. Полихета *Nereis virens* принадлежит к другой эволюционной ветви животных — Lophotrochozoa — и растет на протяжении почти всей жизни за счет появления новых сегментов из субтерминальной зоны роста. Зона роста представлена кольцом поверхностных клеток, редко, асимметрично и синхронно делящихся. Эти клетки являются ранними потомками 2d-бластомера, дающего также и линию эктодермальных телобластов. Указанные свойства позволяют характеризовать эти клетки как стволовые. Кроме того, в зону роста входят и активно пролиферирующие потомки стволовых клеток. В этой зоне экспрессируется ген *Nvi-Cad*, полиморфный рисунок экспрессии которого отражает сложную динамику событий в популяции клеток зоны роста. Эти события связаны с интенсивной клеточной пролиферацией и формированием нового сегмента. Полихета *N. virens* способна регенерировать постериальные структуры тела — зону роста и пигидиум. Однако клеточные источники этой регенерации еще не определены. Формирование новой зоны роста при регенерации червя начинается через 3—4 ч после ампутации и непрерывно сопровождается интенсивной экспрессией гена *caudal* в области раневой поверхности и в прилежащих тканях. Новые сегменты начинают формироваться только после образования новой зоны роста, маркированной экспрессией гена *Nvi-Cad*. Эта экспрессия говорит о возможной вовлеченности гена *Nvi-Cad* в процессы установления и поддержания недифференцированного состояния клеток зоны роста у полихеты *N. virens*. Вовлеченность гена *Cad/Cdx* в процессы функционирования субтерминальной зоны роста у животных различных эволюционных ветвей указывает, вероятно, на

то, что эта функция была присуща общему предку всех билатеральных животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-49654).

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МУТАГЕНА ДИПИНА НА СТВОЛОВЫЕ СПЕРМАТОГОНИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ И КЛЕТКИ НИШИ (КЛЕТКИ СЕРТОЛИ) У УСКОРЕННО СТАРЕЮЩИХ МЫШЕЙ ЛИНИИ SAMP1. © А. Ю. Кулибин,¹ С. Т. Захидов,^{1,2} Т. Л. Маршак.¹ ¹ Институт биологии развития РАН, Москва, 4361.idb@bk.ru, и ² Московский государственный университет.

Известно (Захидов и др. Онтогенез, 2002, 33: 444—456), что процессы становления, развития и функционирования сперматогенного эпителия у мутантных мышей линии SAMP1 идут на фоне высокой генетической нестабильности. Это стимулировало нас к изучению действия дипина в генетически активной дозе (30 мг/кг) на стволовой компонент семенников (стволовые сперматогонимальные клетки и клетки сети семенника), а также на клетки Сертоли, являющиеся основным компонентом ниши стволовых сперматогониев. В отличие от общепризнанной точки зрения полученные нами ранее результаты (Захидов и др. Докл. РАН, 1995, 344: 692—694) показали, что обязательным условием восстановления сперматогенеза у животных с нормальной длительностью жизни является резкое увеличение числа высокодифференцированных клеток Сертоли за счет их пролиферации. Проведенные цитогенетические исследования обнаружили, что хромосомные повреждения, индуцированные в клетках стволового компонента семенника, носят необратимый характер. Об этом свидетельствует высокая частота встречаемости сперматогонимальных и мейотических микроядерных aberrаций, существенно превышающая уровень спонтанной хромосомной мутабельности, на отдаленных сроках последствия (35—100-е сут фиксации). Появление у подопытных мутантных мышей линии SAMP1 в популяции клеток Сертоли единичных митотических фигур и меченных ³H-тимидином ядер указывает на способность этих высокодифференцированных клеток к пролиферации. Однако у ускоренно стареющих мышей эта тенденция выражена значительно слабее, чем у животных с нормальной продолжительностью жизни. В восстановлении нарушенного мутагеном развития мужских половых клеток у ускоренно стареющих мышей принимают участие оба источника регенерации сперматогенного эпителия: стволовые клетки, расположенные на базальной мембране семенных канальцев, как это было отмечено у нормально стареющих мышей-гибридов, подвергшихся действию дипина (Захидов. Изв. РАН, Сер. биол., 1994, 870—879), и предшественники сперматогенных клеток и клеток Сертоли, расположенные в сети семенника (rete testis). Существенно, что второй из указанных источников регенерации у животных с нормальной продолжительностью жизни включается только в случае полного нарушения сперматогенеза (Курносова, Райцина. Онтогенез, 1987, 18: 181—191).

СТРУКТУРЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ПОЛИ(А)⁺-РНК В ЯДРАХ ООЦИТОВ НА СТАДИИ ЛАМПОВЫХ ЩЕТОК.

© Т. В. Куликова, А. М. Злотина, А. В. Красикова, С. Е. Дерюшева, Е. Р. Газинская. Биологический научно-исследовательский институт С.-Петербургского государственного университета, chromas@paloma.spbu.ru.

На большей части боковых петель хромосом типа ламповых щеток (ЛЩ) интенсивная транскрипция осуществляется ферментом РНК-полимеразой II, транскрипты которой, за исключением нескольких специфических типов РНК, подвергаются 3'-полиаденилированию. Для выявления в ядрах ооцитов курицы структур, содержащих поли(А)⁺-РНК, мы применили FISH с биотинилированным олигонуклеотидом (dT)₃₀ в качестве зонда. Как и следовало ожидать, в РНП-матриксе нормальных боковых петель ЛЩ гибридационный сигнал полностью отсутствовал. Однако зонд интенсивно гибридизовался с матриксом гигантских терминальных петель (TGL), с так называемой спагетти-маркером на коротком плече бивалента 2 и с маркерной структурой в середине длинного плеча бивалента 3. Гибридационный сигнал был чувствителен к обработке препаратов нуклеазой S7, но не к обработке РНКазой А, что характеризует последовательности-мишени как поли(А)⁺-«хвосты» гЯРНК. Особенно интересным представляется обнаружение поли(А)⁺-РНК в TGL. TGL формируются в терминальных нейронах ряда макро- и микрохромосом курицы, а у зяблика и голубя — почти на всех хромосомах. Эти хромосомоспецифичные структуры отличаются от нормальных боковых петель не только морфологией, но и отсутствием в них синтеза РНК, что показано нами с помощью инъекций бром-УТФ в ооцит. В то же время TGL обогащены факторами сплайсинга (мяРНП и SC35) и интенсивно окрашиваются флуоресцентными красителями, специфичными к РНК. По окончании фазы ЛЩ TGL не исчезают и остаются связанными с хромосомами. Эти свойства позволяют предполагать, что в TGL может накапливаться и храниться поли(А)⁺-РНК, синтезированная в транскрипционно активных районах хромосом. Для того чтобы выявить источники РНК, обнаруживаемой в TGL, мы применили метод «хромосомного пэинтинга» на препаратах ЛЩ курицы. Все использованные хромосомоспецифичные зонды («пэинты») гибридизовались с РНП-матриком нормальных боковых петель соответствующих хромосом. «Пэинты» хромосом 5 и 8 гибридизовались как со своими TGL, так и с TGL на других ЛЩ, тогда как «пэинты» 10 и 7 не гибридизовались ни со своими TGL, ни с TGL на других хромосомах. Компьютерный анализ баз данных расшифрованных последовательностей генома курицы показал, что в хромосомах 10 и 7 нет генов мяРНК, тогда как хромосомы 5 и 8 содержат такие гены. Таким образом, в TGL хромосомные пэинты гибридизуются скорее с мяРНК, нежели с поли(А)⁺-РНК. Мы допускаем, что поли(А)⁺-РНК, обнаруживаемая в TGL при гибридизации с олиго-dT, могла подвергнуться посттранскрипционным модификациям, в частности гиперредактированию, и поэтому не детектируется с помощью хромосомоспецифичных геномных ДНК-зондов. Характерные особенности TGL (отсутствие транскрипции и обогащенность факторами сплайсинга) делают их похожими на «особую» петлю (special loop — SL) бивалента 3 *Xenopus leavis*. В этой петле аккумулируется и запасается редактирующий РНК фермент аденозин дезаминаза 1 (ADAR 1) и в отличие от большинства нормальных боковых петель эта петля не содержит белка L комплекса

гяРНК (Sallacz, Jantsch, 2005). Сходство SL и TGL подтверждается полученными нами данными об отсутствии белка L в TGL и об обогащенности SL *Xenopus* поли(A)⁺-РНК. Таким образом, TGL на ЛЩ птиц и «особая» петля на ЛЩ 3 *Xenopus* могут представлять собой единый класс внутриядерных доменов, накапливающих гиперредактированную поли(A)⁺-РНК и факторы сплайсинга.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-48252-а).

МАЛЫЕ Alu-РНК АССОЦИИРОВАНЫ С ПРОТЕАСОМАМИ. © В. А. Куличкова, А. С. Цимоха, А. Г. Миттенберг, Ю. В. Ватажок, И. Н. Евтеева, Ю. Б. Ермолаева, И. М. Константинова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ikonst@mailcytspb.rssi.ru.

Исследование роли малых РНК в контроле генной экспрессии продолжает оставаться одной из горячих точек молекулярной биологии клетки. К наиболее активно изучаемым относится явление РНК-интерференции. Структурно-функциональное разнообразие регуляторных некодирующих РНК значительно шире разнообразия малых РНК, участвующих в РНК-интерференции. Эти РНК, в частности транскрипты ретрозонов, участвуют в регуляции генной экспрессии на транскрипционном и посттранскрипционных уровнях, контролируя модификацию хроматина, модулируя активность транскрипционных факторов и влияя на стабильность, процессинг и трансляцию мРНК. Вопрос о природе и функциях РНК, ассоциированных с протеасомами, остается открытым. В настоящей работе обнаружена ассоциация малых РНК с популяциями протеасом, изолированными из клеток печени крысы и из клеток человека линии K562. Показано, что с популяцией протеасом в клетке ассоциирован набор малых РНК, включающий в себя РНК-транскрипты ретрозонов Alu (B1). С помощью электрофореза высокого разрешения в ПААГ исследовали спектр РНК (меченных ³²P-ЦДФ по 3'-концам с помощью РНК-лигазы), ассоциированных с протеасомами. Результаты показали, что исследуемые РНК представлены дискретным набором малых РНК (11 основных подклассов и минорных РНК) с размерами в диапазоне 20—360 нуклеотидов. При электрофорезе выявлено также наличие фракций РНК, соответствующих по размерам малым интерферирующим РНК (20—25 нуклеотидов). С целью анализа транскрипционного происхождения РНК, ассоциированных с протеасомами, применен новый способ выявления РНК-транскриптов РНК-полимеразы III. Использовали специфический адаптер, который лигировался только с промотором РНК-полимеразы III, что позволяло избирательно транскрибировать продукты этой полимеразы. Данным методом продемонстрировали, что набор РНК, ассоциированных с популяцией протеасом, очищенных из клеток печени крысы, содержит малые РНК B1 (Alu) — подлинны транскрипты РНК-полимеразы III. С помощью метода RT-PCR, используя специфические праймеры, показали, что ассоциированные с популяцией протеасом РНК из клеток K562 содержат Alu-РНК. Методом Нозерн-гибридизации подтверждено наличие Alu-транскриптов в составе РНК, ассоциированной с цитоплазматическими протеасомами, выделенными из клеток K562. Для выяснения роли ма-

лых РНК, ассоциированных с протеасомами, проводится исследование их влияния на специфичность эндорибонуклеазной активности протеасом (путем удаления РНК обработкой микрококковой нуклеазой и сравнительного анализа картин продуктов нуклеолиза индивидуальных мРНК).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-4966) и С.-Петербургского научного центра РАН.

УЧАСТИЕ ТИРОЗИНКИНАЗ И ТИРОЗИНФОСФАТАЗ ВО ВЛИЯНИИ ОКИСЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА И ПРЕПАРАТА ГЛУТОКСИМА НА ВНУТРИКЛЕТОЧНУЮ КОНЦЕНТРАЦИЮ Ca²⁺ В ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГАХ. © Л. С. Курилова, З. И. Крутецкая, О. Е. Лебедев, В. Г. Антонов, Н. И. Крутецкая. С.-Петербургский государственный университет.

Окисленный глутатион (GSSG) — низкомолекулярный тиол, выявляемый во всех типах клеток и внеклеточном пространстве. Содержание GSSG в клетках и вне их невелико и жестко регулируется относительно сопряженного с ним восстановленного глутатиона (GSH). Работы последних лет по изучению действия на клетки GSSG показали его способность оказывать рецепторопосредованное влияние на клеточные процессы. Кроме того, синтетический аналог GSSG — фармакологический препарат Глутоксим — нашел клиническое применение как иммуномодулятор и гемостимулятор в комплексной терапии бактериальных и вирусных заболеваний, псориаза, лучевой и химиотерапии в онкологии. Ранее нами было показано, что GSSG и Глутоксим увеличивают внутриклеточную концентрацию Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i), вызывая мобилизацию Ca²⁺ тапсигаргин-чувствительных Ca²⁺-депо и последующий вход Ca²⁺ в перитонеальные макрофаги крысы. В то же время механизмы, опосредующие регуляторное влияние GSSG и Глутоксима на [Ca²⁺]_i, остаются неясными. Известно, что окислительный стресс и уменьшение соотношения GSH/GSSG внутри клетки вызывают изменение активности редокс-чувствительных ферментов, в первую очередь тирозинкиназ и тирозинфосфатаз, что приводит к увеличению фосфорилирования белков по тирозину. Для выявления возможной роли фосфорилирования по тирозину во влиянии GSSG и Глутоксима на [Ca²⁺]_i в перитонеальных макрофагах крысы мы исследовали влияние на Ca²⁺-ответ индуцируемых GSSG или Глутоксимом двух структурно различных ингибиторов тирозинкиназ генестейна и метил-2,5-дигидроксициннамата (МДЦ), а также ингибитора тирозинфосфатаз ортованадата Na (Na₃VO₄). С использованием флуоресцентного Ca²⁺-зонда Fura-2AM показано, что добавление генестейна или МДЦ на фоне развившегося входа Ca²⁺ приводит к полному подавлению увеличения [Ca²⁺]_i, вызванного GSSG или Глутоксимом, и возвращению [Ca²⁺]_i к базальному уровню. Кроме того, предварительная инкубация макрофагов с генестейном в течение 7 мин до введения GSSG или Глутоксима приводит к практически полному подавлению увеличения [Ca²⁺]_i, вызванного GSSG или Глутоксимом, и подавлению входа Ca²⁺. В то же время показано, что добавление Na₃VO₄ изменяющего баланс между активностью тирозинкиназ и тирозинфосфатаз, за 2 мин до введения GSSG или Глутоксима вызывает некоторое усиление вызванного GSSG или Глутоксимом Ca²⁺-ответа, связанного с мобилизацией

Ca^{2+} из депо, а также последующего входа Ca^{2+} из наружной среды. Добавление генистейна на фоне развившегося входа Ca^{2+} приводит к возвращению $[\text{Ca}^{2+}]_i$ к базальному уровню. Таким образом, обработка клеток Na_3VO_4 усиливает индуцированный Глутоксимом или GSSG Ca^{2+} -ответ, но не предотвращает последующего ингибирования входа Ca^{2+} генистейном. Можно предположить, что стимуляция входа Ca^{2+} под действием GSSG или Глутоксима обусловлена активацией тирозинкиназы и повышением фосфорилирования по тирозину Ca^{2+} канала в плазматической мембране. Возможно также, что вызываемая GSSG или Глутоксимом мобилизация Ca^{2+} из депо связана с фосфорилированием по тирозину и активацией канала рецептора инозитол-1,4,5-трифосфата в мембране эндоплазматического ретикулума. Кроме того, мишенями для ковалентной модификации GSSG или Глутоксимом могут быть сами тирозинфосфатазы. Полученные данные свидетельствуют об участии тирозинкиназы и тирозинфосфатаз во влиянии GSSG или Глутоксима на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в перитонеальных макрофагах. Учитывая, что генистейн и МДЦ блокируют широкий спектр тирозинкиназ, можно предположить, что в регуляторном влиянии Глутоксима или GSSG на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ могут участвовать как рецепторные, так и цитоплазматические тирозинкиназы.

ПРОВЕРКА ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОЛЛАГЕНОВ С ТЕЛОПЕПТИДАМИ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ТЕЛЯЧЬЕЙ И ОВЕЧЬЕЙ ШКУР МЕТОДОМ КИСЛОТНОЙ И ЩЕЛОЧНО-СОЛЕВОЙ ЭКСТРАКЦИИ, В КАЧЕСТВЕ СУБСТРАТОВ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК.
© Л. В. Кухарева,¹ Т. А. Крылова,¹ И. И. Шамолина.²
¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и ² С.-Петербургский университет технологии и дизайна.

В качестве субстратов для культивирования клеток, в том числе стволовых, в ряде случаев используется белопептидный коллаген, полученный из телячьей шкуры через пепсин, или коллаген с телопептидами, полученными из сухожилий крысиного хвоста. Цельный коллаген из телячьей шкуры используется редко, а щелочно-солевой коллаген, представляющий собой смесь всех содержащихся в коже типов коллагена, слегка поврежденных щелочным гидролизом, практически никогда. Мы получили щелочно-солевые коллагены из солевой шкуры взрослой овцы и свежей телячьей шкуры и кислоторастворимый коллаген из свежей телячьей шкуры. Все они оказались вполне пригодными в качестве субстратов для первичной культуры мезенхимных клеток человека, полученной из костного мозга эмбриона человека. Все варианты предложенных субстратов не повлияли на скорость пролиферации этих клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной по Государственному контракту № 02.435.11.3020 от 19 сентября 2005 г. «Метод восстановления эпителиально-мезенхимных дефектов с помощью стволовых клеток» (шифр Лот № 2005-МСС-13.1/001).

МЕТАФАЗНЫЙ БЛОК МЕЙОЗА У МОРСКИХ ЗВЕЗД.
© Н. Е. Ламаш. Институт биологии моря ДВО РАН, Владивосток.

Развитие ооцитов морских звезд блокируется в профазе первого деления мейоза. Возобновление делений мейоза происходит под действием мейозиндуцирующего гормона 1-метиладенина (1-МеА). У многих животных процесс мейоза вторично блокируется в метафазе. Считается, что у морских звезд отсутствует второй блок мейоза. Этот вывод сделан на основании экспериментальных данных, полученных при культивировании ооцитов вне гонады. Подобная схема эксперимента является искусственной, поскольку у морских звезд процесс индукции созревания начинается внутри гонады. Для того чтобы оценить вклад клеток гонады в индуцированное 1-МеА созревание ооцитов, изучали хронологию делений мейоза у морской звезды *Aphelastrias japonica* в двух вариантах экспериментов. В первом случае освобожденные от фолликулярных клеток ооциты инкубировали в искусственной морской воде (ASW), в которую добавляли 1-МеА. Во втором случае 1-МеА вводили животным в полость луча. Для решения поставленных задач использовали хронометрирование легко регистрируемых с помощью светового микроскопа событий мейоза — разрушение мембраны зародышевого пузырька (РЗП), свидетельствующее о снятии профазного блока мейоза, отделение первого и второго полярных телец (ПТ). В культуре ооцитов при температуре воды 18 °С РЗП практически во всех клетках происходило в среднем через 20 мин после начала инкубации с 1-МеА (10^{-7} М). Первое ПТ выделялось через 90 мин после действия гормона, а второе — через 120 мин. После инъекции раствора 1-МеА (10^{-5} М) в полость лучей морских звезд через 30—40 мин начинался вымет гамет, который продолжался в течение 3—4 ч. Вскрытие гонад инъектированных животных показало, что через 35—40 мин у всех ооцитов произошло РЗП, но ПТ не выделялись даже спустя 90 и 150 мин после инъекции. При помещении ооцитов в морскую воду через 20 мин у них происходило отделение первого ПТ, а через 35—40 мин — второго. Следовательно, развитие ооцитов останавливается в гонаде под воздействием неизвестных факторов после РЗП. Было обнаружено, что формированию первого ПТ предшествует индуцированное 1-МеА повышение уровня внутриклеточного pH за счет активации Na^+/H^+ -антипорта. Не исключено, что этот ионообменник является мишенью для факторов, блокирующих развитие ооцитов. С целью проверки выдвинутого предположения изучили влияние ионов натрия ($-\text{NaASW}$) с гормоном созревания (10^{-7} М). Контролем служила группа ооцитов, созревающих при действии 1-МеА в искусственной морской воде (ASW) обычного состава с pH 8.0. В экспериментальной и контрольной группах ооцитов РЗП происходило в среднем через 20 мин после начала инкубации с 1-МеА. В контрольных клетках через 70 мин после начала действия гормона наблюдалось выделение первого ПТ, а через 90 мин — второго. В среде без ионов натрия формирования ПТ не происходило. При замене $-\text{NaASW}$ на нормальную морскую воду уже через 20 мин в ооцитах формировалось первое ПТ, а спустя 25—30 мин — второе. Эти результаты свидетельствуют о том, что ионы натрия не влияют на РЗП, но их отсутствие во внешней среде ингибирует дальнейшие события мейоза. К такому же заключению мы пришли после изучения влияния ионов натрия на созревание ооцитов, выделенных из гонад животных, которым пред-

варительно был инъецирован 1-МеА. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что ингибирование Na^+/H^+ -ионообменника может быть одним из механизмов, обуславливающих метафазный блок мейоза у морских звезд. Таким образом, впервые установлено, что развитие ооцитов морской звезды блокируется в гонаде вторично в метафазе I. Метафазный блок мейоза поддерживается ингибированием увеличения внутриклеточного уровня pH.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и ДВО РАН (грант ДВО-РФФИ № 06-04-96039-р_восток_a).

ВЛИЯНИЕ IN VITRO ПОЛОВЫХ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ИЗ ПРЕОВУЛЯТОРНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ КУР. © В. А. Лебедев,¹ И. Ю. Лебедева,¹ Р. Гроссманн,² Н. Парвизи.² ¹ Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных РАСХН, Санкт-Петербург—Пушкин, и ² Институт животноводства, Мариензее, Германия.

Половые стероидные гормоны являются важными регуляторами овариального фолликулогенеза, однако их роль в модуляции пролиферации фолликулярных клеток позвоночных, в том числе птиц, до сих пор неясна. Ранее было показано, что преовуляторное возрастание уровня половых стероидных гормонов в крови кур связано с кратковременным прекращением роста текальной ткани (Lebedev et al., 2006), а также со снижением интенсивности синтеза ДНК в культивируемых клетках гранулезы (Tischkau et al., 1997). В этой связи в представленной работе исследовано in vitro влияние эстрадиола-17β и прогестерона на пролиферативную активность клеток теки и гранулезы кур из фолликулов с различной степенью зрелости. Клетки выделяли из преовуляторных фолликулов двух категорий — F1 (самый большой фолликул) и F3 (третий по размеру фолликул) — и культивировали в 96-луночных планшетах в течение 40 ч в 100 мкл среды, не содержащей сыворотки. Начальная концентрация клеток составляла $4 \cdot 10^5$ на 1 мл. Среда в опытных группах содержала эстрадиол-17β (1 или 10 нг/мл) или прогестерон (10 или 100 нг/мл). Пролиферативную активность клеток оценивали колориметрическим методом (Yao, Bahr, 2001) при использовании коммерческого набора CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). До или после культивирования в лунки с клетками добавляли 100 мкл реагента CellTiter 96 Aqueous One Solution, инкубировали клетки в течение 3 ч и измеряли оптическую плотность реакционной смеси при длине волны 450 нм. В качестве контроля служила оптическая плотность, которую измеряли в лунках с клетками до культивирования и принимали за 100 % от начального числа жизнеспособных клеток. Было обнаружено, что прогестерон и эстрадиол-17β оказывают различное влияние на фолликулярные клетки разного типа. Внесение в среду прогестерона в концентрации 10 или 100 нг/мл тормозило возрастание числа жизнеспособных клеток теки из фолликулов F3 в процессе культивирования (до 174.4 ± 4.9 и 175.7 ± 4.9 % соответственно против 199.3 ± 4.8 % в контроле, $P < 0.05$). В случае фолликулов F1 число жизнеспособных текальных клеток было

ниже в среде, содержащей 100 нг/мл прогестерона, по сравнению со средой, содержащей 1 или 10 нг/мл эстрадиола-17β ($P < 0.05$). При этом последний не оказывал модулирующего влияния на пролиферативную активность клеток теки из фолликулов обеих категорий. Напротив, внесение эстрадиола-17β в концентрации 1 или 10 нг/мл в среду культивирования приводило к повышению числа жизнеспособных клеток гранулезы из фолликулов F3 (с 201.1 ± 6.2 % в контроле до 249.8 ± 6.3 и 250.5 ± 6.3 % соответственно, $P < 0.01$). Эстрадиол-17β стимулировал пролиферацию клеток гранулезы из фолликулов F1 только при концентрации 10 нг/мл ($P < 0.05$). Не было выявлено влияния прогестерона на пролиферативную активность гранулезных клеток из фолликулов как F1, так и F3. Полученные данные свидетельствуют о том, что прогестерон оказывает ингибирующее влияние на пролиферативную активность клеток теки, тогда как эстрадиол-17β стимулирует пролиферацию клеток гранулезы in vitro. При этом чувствительность фолликулярных клеток к половым стероидным гормонам снижается на завершающей стадии созревания преовуляторных фолликулов кур.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНОГО СТАТУСА СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ПРИ ИХ СОКУЛЬТИВИРОВАНИИ С КЛЕТКАМИ СЕРДЦА. © Г. Е. Левина,¹ Ю. В. Маленьких,¹ Н. С. Николаенко,² Г. П. Пинаев.² ¹ С.-Петербургский политехнический университет и ² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

В последние годы проведен ряд исследований по изучению дифференцировки стромальных клеток костного мозга (СККМ) в кардиомиоцитарном направлении. Одним из экспериментальных подходов в них является совместное культивирование СККМ с клетками сердца, способными обеспечивать специфическое микроокружение и способствовать направленной дифференцировке СККМ. Так, ранее нами было показано, что СККМ человека могут сокращаться синхронно с сокультивируемыми функционально активными кардиомиоцитами новорожденных крысят. Однако изменений маркеров дифференцировки СККМ не было обнаружено. Другую модель кардиомиогенеза in vitro представляют клетки сердца взрослых животных, которые не формируют в культуре функционально активных сокращающихся структур и поэтому их действие на СККМ может быть иным. В связи с этим в данном исследовании было проведено совместное культивирование СККМ, а также свежeweделенных моноклеаров костного мозга с клетками сердца взрослых крыс. С помощью метода непрямой иммунофлуоресценции была изучена экспрессия маркеров дифференцировки кардиомиоцитов (мышечного α-актинина, тропонина I и миозина II) и показано, что только при сокультивировании свежeweделенных клеток сердца и моноклеаров костного мозга через 7—10 сут можно было наблюдать небольшое количество (1—2 в поле зрения) клеток, содержащих маркер дифференцировки. Кроме того, среди сокультивируемых клеток обоих типов обнаруживали большее (по сравнению с культивируемыми контрольными клетками костного мозга или клетками сердца) количество гликогенсодержащих клеток. Полученные данные свидетельствуют о взаимном влиянии клеток сердца и моноклеаров костного мозга на изме-

нение их дифференцировочного статуса в кардиомиоцитарном направлении.

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ Фуллеренсодержащих соединений при действии их на клеточные модели *in vitro*.

© Л. Ф. Литвинчук, П. А. Погорельый, Л. Б. Пиотровский, Е. А. Николаева, В. П. Добрица, О. И. Киселев. ГУ Научно-исследовательский институт гриппа РАМН, ГУ Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН и Государственный научно-исследовательский институт ОЧБ, Санкт-Петербург.

Информация последних лет о фуллеренах и их модификациях дает представление о широком спектре биологической активности, носящей, как правило, позитивный характер, но имеются немногочисленные работы, свидетельствующие о токсичности некоторых форм фуллеренов. Уникальные химические и электронные свойства молекулы C_{60} , ее компактность, размеры и геометрия, гидрофобные и липофильные свойства, мембранотропность определяют два основных типа биологической активности — окислительную, которая является следствием фотоактивности молекулы фуллерена, и антиоксидантную. Целью настоящей работы было исследование на клеточных моделях биологической активности водорастворимых нековалентно-связанных комплексов фуллерена C_{60} и поливинилпирролидона (C_{60} /ПВП) и молекулярных коллоидных растворов C_{60} (FWS). Использовали культивирование клеток *in vitro*, прижизненную, светооптическую и люминесцентную микроскопию, микрофотографирование, микротетразолиевый тест (МТТ-тест) для оценки метаболической активности клеток и их жизнеспособности, определяли индекс пролиферации клеток. Было использовано 13 клеточных линий различного происхождения, в том числе 2 линии нормальных фибробластов человека, 7 опухолевых линий человека, линии клеток из почек обезьян и свиньи. Установлено, что в широком диапазоне концентраций (125—3500 мкг/мл) все тестируемые препараты не оказывали острого или хронического токсичного действия на все использованные клетки. При культивировании клеток в присутствии каждого из тестируемых фуллеренсодержащих препаратов не угнеталось клеточное дыхание (МТТ-тест), не подавлялась пролиферативная активность, не происходило морфологических изменений как монослоя, так и клеток. Присутствие фуллеренов в питательной среде продлевало продуктивный срок жизни клеточной культуры в 1.5—2.0 раза, замедляло возрастную деградацию клеточной популяции при наблюдении культур до 2—3 нед. Выявлен эффект стимуляции пролиферативной активности клеток всех типов для всех тестируемых образцов фуллерена C_{60} . Комплексы C_{60} /ПВП с наибольшим содержанием фуллерена (2 %) отличались наиболее выраженным стимулирующим действием. Для нормальных фибробластов в этом случае наблюдалось увеличение индекса пролиферации в 1.2—1.7 раза. Показано цитопротекторное действие фуллерена при воздействии на клетки факторов деструкции различной природы (герпетическая вирусная инфекция и окислительный стресс). Таким образом, полученные результаты подтверждают многочисленные литературные данные о биологических эффектах фуллеренсодержащих комплексов. Позитивное влияние соединений фуллерена

на разные по морфологии и гистогенезу клетки, выражающееся в задержке старения культур, репаративном и протективном влиянии при цитопатогенном действии вируса герпеса 1-го и 2-го типов, служат предпосылками для создания препаратов универсального профилактического действия для наружного применения.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной по Российской исследовательской программе «Фуллерены и атомные кластеры» и по проекту МНТЦ № 2592 «Лазерная фуллерен-кислородная терапия „Биолофт”».

ИССЛЕДОВАНИЕ СЕЛЕКТИВНОЙ ФОТОТОКСИЧНОСТИ Фуллеренсодержащих соединений на клеточных моделях *in vitro*. © Л. Ф. Литвинчук, П. А. Погорельый, Л. Б. Пиотровский, Е. А. Николаева, В. П. Добрица, О. И. Киселев. ГУ Научно-исследовательский институт гриппа РАМН, ГУ Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН и Государственный научно-исследовательский институт ОЧБ, Санкт-Петербург.

Среди болезней XXI в. ведущие позиции занимают вирусные и раковые заболевания. Поэтому противоопухолевая и противовирусная активность фуллерена C_{60} и его активное взаимодействие с множеством биологических мишеней в клетке открывают определенные перспективы в поисках клинического применения этих наноструктур. Целью настоящей работы было изучение условий реализации селективной фототоксичности комплексов фуллерена C_{60} в отношении онкогенных и неонкогенных линий клеток человека. Тестировали три образца нековалентно-связанных водорастворимых комплексов фуллерена C_{60} и поливинилпирролидона (C_{60} /ПВП) и два гидратированных молекулярных коллоидных 0.4%-ных раствора фуллерена C_{60} (С FWS). Комплексы C_{60} /ПВП различались по содержанию C_{60} (0.7, 1.8 и 2.0 %) и по молекулярной массе поливинилпирролидона (соответственно 25 000, 20 000 и 40 000 кДа). Используемые концентрации комплексов C_{60} /ПВП варьировали в пределах 100—3500 мкг/мл, что соответствовало содержанию чистого фуллерена в средах 0.03—0.05 %. Используются следующие опухолевые клеточные линии человека: рабдомиосаркома (RD), глиобластома (Т-98), карцинома гортани (HEp-2), карцинома сигмовидной кишки (Colo320) и лейкемия (L-41). Для сравнения в качестве клеток неонкогенного происхождения были использованы линии фибробластов легкого нормального эмбриона человека (ФЛЭЧ), почки зеленой мартышки (Vero), почки макаки-резус (MA-104), почки свиньи (СПЭВ) и фибробласты мыши (L-929). Производили культивирование клеток *in vitro*, использовали прижизненную, светооптическую и люминесцентную микроскопию, микрофотографирование и микротетразолиевый тест (МТТ-тест) для оценки метаболической активности клеток и их жизнеспособности. Методом прямого контакта исследовали и оценивали цитотоксичность и морфологические изменения при культивировании клеток в обычных условиях при минимальном освещении и при облучении светом галогеновой лампы с плотностью освещения 20—30 мкВт/см². В разных опытах варьировали концентрацию C_{60} -соединений и время их контакта с клетками, длительность облучения и сроки наблюде-

ния. Воздействия производили на клетки, помещенные в 96-луночные планшеты, при этом на каждый планшет помещали и раковые, и нормальные клетки, а также дублировали культуры для облучения только половины планшета. Было установлено, что при определенном сочетании вышеупомянутых параметров культивирования все пять исследованных фуллеренсодержащих препаратов проявили свойства фотосенсибилизаторов. Облучение опухолевых клеток привело к существенному угнетению метаболической активности вплоть до полной деструкции в отдельных вариантах. В таких же условиях изменения в неонкогенных клетках не носили столь фатального характера и не приводили к деструктивным процессам. Таким образом, оказался возможным подбор условий, при которых проявляется фотодинамическая активность фуллеренсодержащих комплексов, т. е. генерирование активных форм кислорода, в том числе синглетного; соответственно происходит деструкция клеток, причем цитотоксичность фуллеренсодержащих комплексов по отношению к онкогенным клеткам сочетается с минимальным повреждением нормальных клеток, т. е. их цитотоксичность селективна, что может быть связано с различным физико-химическим статусом раковых и нормальных клеток. Полученные результаты показывают, что фотохимическая активность молекул фуллерена в отношении индукции активных форм кислорода в 3—12 раза выше таковой фотосенсибилизаторов на основе красителей. Эти данные позволяют предполагать, что фуллерены могут быть использованы как нетоксичные и фотосенсибилизаторы при фотодинамической терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной по Российской исследовательской программе «Фуллерены и атомные кластеры» и по проекту МНТЦ № 2592 «Лазерная фуллерен-кислородная терапия „Биолофт“».

ВКЛЮЧЕНИЕ ФРАГМЕНТОВ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ ДНК В ГЕНОМ КЛЕТОК НЕКОТОРЫХ ТКАНЕЙ ВЗРОСЛЫХ МЫШЕЙ ПРИ ОДНОВРЕМЕННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ЦИТОСТАТИКА ЦИКЛОФОСФАМИДА И ПРЕПАРАТА ЭКЗОГЕННОЙ ДНК ЧЕЛОВЕКА. © А. С. Лихачева,¹ В. П. Николин,² Н. А. Попова,² Т. Д. Дубатолова,² Д. Н. Стрункин,³ В. А. Рогачев,² Т. Е. Себелева,² И. С. Ерофеев,⁴ Л. А. Якубов,⁵ С. С. Богачев,^{2, 5, 6} М. А. Шурдов.^{5, 6}
¹ Факультет естественных наук Новосибирского государственного университета, ² Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, labmolbiol@mail.ru, ³ Новосибирский онкологический диспансер, ⁴ Московский физико-технический институт, ⁵ Panagenic International Inc., США, и ⁶ ООО «Панаген».

В организм экспериментальных мышей парентерально были введены препарат фрагментированной ДНК человека и алкилирующий цитостатик циклофосфамид, индуцирующий поперечные сшивки в молекуле ДНК. Был проведен молекулярно-генетический анализ геномной ДНК экспериментальных животных на основе структуры Alu-повторов человека и аналогичных B1-повторов мыши. В результате анализа было обнаружено, что фрагменты человеческой ДНК достигают ядерного пространства клеток трех изученных органов — печени, тимуса, селезенки — и встраиваются в геном мыши. Включение в геном мыши экзогенной ксеногенной ДНК приводит к

изменению формулы крови и гибели животных. Предполагается, что механизм интеграции связан с репаративными событиями, индуцированными образованием ковалентных межцепочечных сшивок, и как следствие — с образованием двухцепочечных разрывов при блокировании репликативной вилки.

КАЧЕСТВЕННЫЕ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭКСТРАКЛЕТОЧНОЙ ДНК, ДОСТАВЛЯЕМОЙ В ЯДРА ЖИВЫХ КЛЕТОК. © А. С. Лихачева,¹ В. А. Рогачев,² О. Врацких,¹ Л. В. Мечетина,² Т. Е. Себелева,² Л. А. Якубов,³ С. С. Богачев,^{2—4} М. А. Шурдов.^{3, 4}
¹ Факультет естественных наук Новосибирского государственного университета, ² Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, labmolbiol@mail.ru, ³ Panagenic International Inc., США, и ⁴ ООО «Панаген».

Плазма крови и другие межтканевые жидкости в норме всегда содержат определенное количество ДНК, попадающее туда вследствие естественной гибели клеток организма. Экстраклеточная ДНК захватывается клетками этого организма и доставляется в различные клеточные компартменты. За счет экстраклеточной ДНК могут происходить перенос генетической информации и ее фиксация в геноме реципиентной клетки. Предполагается, что экстраклеточная ДНК, достигшая пространства ядра, попадает под действие репаративно-рекомбинационной машины клетки. В результате происходящих при этом событий происходят интеграция экстраклеточной ДНК в реципиентный геном и включение новой генетической информации в метаболические процессы, протекающие в клетке. В предполагаемой работе на культуре клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 были проведены количественный анализ и анализ качественных признаков ДНК, транспортируемой во внутриклеточное пространство. Было обнаружено, что экстраклеточная ДНК практически мгновенно (менее 1 мин, если клетки активно делятся) доставляется во все проанализированные компартменты клетки (цитоплазму и ядерное пространство). Кроме того, было выявлено, что ДНК присутствует в межхромосомном пространстве ядра в виде фрагментов различной длины. В нулевой момент времени размер фрагментов соответствует размеру экстраклеточной ДНК, добавленной в среду. Далее ДНК подвергается процессингу — линейный размер фрагментов увеличивается от 500 п. н. до порядка 10 т. п. н. Такое увеличение линейного размера определяется лигированием фрагментов между собой. Количественная оценка показала, что в межхромосомном пространстве может присутствовать до 2.0 % от гаплоидного генома фрагментированной экзогенной ДНК. При цитологическом анализе поведения экстраклеточной ДНК при ее контакте с клетками было обнаружено, что уже в течение 1-х мин меченый материал обнаруживается в цитоплазме, заключенный в вакуоли. В этот момент в ядерном пространстве метка практически не выявляется. Через 14 ч инкубации вся метка оказывается сконцентрированной в ядерных компартментах. Меченый материал располагается в ядре в виде конгломератов и имеет интенсивное свечение.

ЕСТЕСТВЕННАЯ КОРРЕКЦИЯ ГЕНОВ ЧЕЛОВЕКА ПУТЕМ ВОЗДЕЙСТВИЯ ФРАГМЕНТИРОВАННОЙ

ЭКСТРАКЛЕТОЧНОЙ ДНК НА ПРИМЕРЕ ВОССТА-
НОВЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ГЕНА КАСПАЗЫ 3 КЛЕ-
ТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ MCF-7. © А. С. Лихачева,¹
В. А. Рогачев,² Л. В. Мечетина,² А. Г. Шилов,² Т. Е. Се-
белева,² Л. А. Якубов,³ С. С. Богачев,²⁻⁴ М. А. Шур-
дов.^{3,4} ¹ Факультет естественных наук Новосибирско-
го государственного университета, ² Институт цитоло-
гии и генетики СО РАН, Новосибирск, labmolbiol@
mail.ru, ³ Panagenic International Inc., США, и ⁴ ООО «Па-
наген».

Возможность горизонтального переноса генетиче-
ского материала и его фенотипическое проявление в ре-
ципиентной клетке неоднократно описаны в научной ли-
тературе. Существует гипотеза, согласно которой в орга-
низме высших эукариот имеется постоянный оборот
генетического материала, основным источником которого
являются клетки, подвергшиеся апоптозу. В рамках
этой гипотезы предполагается, что существует постоян-
ный обмен генетической информацией между достав-
ленными во внутриядерном пространстве фрагментами
ДНК и соответствующими участками хромосом за счет
гомологичной рекомбинации. В данной работе для под-
тверждения или опровержения предложенной гипотезы
была сформулирована экспериментальная концепция и
выбрана генетическая модель, позволившая доказать
возможность существования определенного в гипотезе
пути утилизации экстраклеточного генетического мате-
риала. Клетки аденокарциномы молочной железы чело-
века MCF-7 несут делецию 47 п. н. в 4-м экзоне гена про-
каспазы 3, что приводит к пропуску 4-го экзона при
сплайсинге и сдвигу рамки считывания с появлением
«преждевременного» стоп-кодона в мРНК. Поэтому в
клетках MCF-7 практически полностью отсутствует
ключевой фермент апоптотического каскада — каспа-
за 3. Фенотипически делеция в гене прокаспазы 3 про-
является в том, что при рецепторопосредованном апоптозе
наблюдается конденсация ядерного материала, но не
происходит специфической нуклеосомной фрагмента-
ции ДНК. Делеция в гене каспазы 3 клеток MCF-7 была
использована в качестве маркерного признака. Было по-
казано, что после культивирования клеток MCF-7 в сре-
де, содержащей фрагментированную ДНК человека, про-
исходит изменение фенотипа клеток и наблюдается по-
явление олигонуклеосомной фрагментации ядерной
ДНК при индукции апоптоза ФНО α . Восстановле-
ние функциональной активности фермента связано с ис-
правлением мутации в 4-м экзоне гена каспазы 3 кле-
ток MCF-7. Обнаружено, что в результате 5-суточной
инкубации с экзогенной ДНК в 3—5 % клеток
MCF-7 наблюдается исправление дефектного локуса.
Полученные результаты свидетельствуют о том, что
существует путь утилизации экстраклеточной фраг-
ментированной ДНК, включающий в себя естественные
механизмы доставки фрагментов в ядро и их гомологич-
ную рекомбинацию с соответствующими локусами хро-
мосом ядра.

ПОВЫШЕННАЯ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ
ТАТА-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА В ЭКСТРАКТАХ
ЯДЕР ПЕРЕВИВАЕМЫХ ОПУХОЛЕЙ ПЕЧЕНИ И
ЛЕГКОГО МЫШЕЙ. © М. В. Лысова, Т. В. Аршинова,
И. А. Драчкова, В. И. Каледин, Л. К. Савинкова. Инсти-
тут цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск.

Из литературных данных (Johnson et al., 2003) изве-
стно, что в клетках карциномы толстой кишки человека
экспрессия ТАТА-связывающего белка (ТВР) повышена
и увеличено количество этого белка по сравнению с нор-
мальным эпителием. Показано, что экспрессия ТВР по-
вышена в карциномах легкого и молочной железы чело-
века и в клеточных линиях карциномы легкого. Известно
также, что в клетках, обработанных форболовым эфиром
(потенциальным активатором протеинкиназы С) или экс-
прессирующим онкоген *Ras*, также наблюдаются повы-
шенные концентрации ТВР. Понижение количества ТВР
также инициирует специфические изменения в экспрес-
сии генов. Так, показано (Um et al., 2001), что при разру-
шении одной копии гена ТВР в линии В-клеток цыпленка
нарушается экспрессия белка-регулятора клеточного
цикла *cdc-25B*-фосфатазы. Разрушение гетерозиготного
гена ТВР в этих клетках вызывает нарушения в митозе, а
также в росте и размере клеток. Имеющиеся данные сви-
детельствуют о том, что способность ТВР участвовать в
транскрипции, осуществляемой РНК-полимеразой II, и
привлекаться на ТАТА-содержащие промоторы необхо-
дима для иницирования клеточной трансформации. Но
остается много нерешенных вопросов о том, нужны ли
для процесса трансформации ТВР-индуцируемые изме-
нения транскрипции, осуществляемой РНК-полимераза-
ми I и III, и достаточны ли они для того, чтобы привести
к образованию опухоли. На данном этапе цель нашей ра-
боты заключалась в изучении ТАТА-связывающей спо-
собности ТВР, входящего в состав белков ядерных экст-
рактов перевиваемых опухолей печени и легких мышей
линии A/Sn и C57BL/6 соответственно. В работе исполь-
зовали перевиваемую гепатокарциному HA-1 и адено-
карциному легких Lewis, полученные из банка опухоле-
вых штаммов нашего института. Опухоли поддерживали
на мышцах линий A/Sn и C57BL/6 соответственно в соли-
дарной форме, перевивая их в мышцы бедра 1 раз в
2 нед. Для получения ядерных экстрактов использовали
периферическую часть опухолевых узлов только что
умерщвленных декапитацией животных (2—4 живот-
ных). В качестве контрольных органов использовали печен-
ь и легкие интактных животных тех же линий. Выделе-
ние ядерных экстрактов, получение меченых олиго-
нуклеотидов и анализ связывания белков с радиоактивно
меченным олигонуклеотидом (EMSA) проводили по
стандартным методикам с использованием «забивочной»
ДНК. Олигодезоксирибонуклеотиды, идентичные ТА-
ТА-содержащему участку промотора AdML длиной
26 п. н. — 5'-tga agg ggg gc TATAAAaggg ggtgc-3'-(ТА-
ТА-ОН), — и контрольный олигонуклеотид с нарушен-
ным ТАТА-боксом — 5'-tga agg tgg gcTGCTAGCgct ggt
gg-3' — метили радиоактивным фосфором с помощью
T4-полинуклеотидкиназы. Образующиеся комплексы
анализировали с помощью метода «торможения» ДНК в
геле. Результаты изучения взаимодействия белков ядер-
ных экстрактов исследуемых опухолей и соответствую-
щих нормальных тканей мышей с ³²P-ТАТА-ОН показа-
ли, что во всех случаях образуется один тип комплексов,
которому соответствует одна полоса задержки в геле,
причем с белками гепатокарциномы и аденокарциномы
легких образуется на 60 и 30 % соответственно больше
комплексов, чем с белками ядерных экстрактов тканей
контрольных животных. При образовании комплексов
наблюдается зависимость их количества от concentra-
ции белка, что свидетельствует о специфичности образу-
емых комплексов. Результаты вытеснения ³²P-ТАТА-ОН

«холодным» ТАТА-ОН из комплексов с белком показали, что ^{32}P -ТАТА-ОН полностью вытесняется из комплексов уже при 25-кратном молярном избытке «холодного» олигонуклеотида, что также свидетельствует о специфическом характере образуемых комплексов ТВР с ^{32}P -ТАТА-ОН. Таким образом, все полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что с ^{32}P -ТАТА-ОН взаимодействует один ТВР. Дополнительным свидетельством в пользу этого является незначительное связывание ТВР с олигонуклеотидом, у которого нарушен ТАТА-бокс. Как известно, ТВР имеет невысокое неспецифическое сродство к ТАТА-содержащей ДНК. Таким образом, полученные в работе данные свидетельствуют об увеличении ТАТА-связывающей активности ТВР и соответственно об изменениях в транскрипционном аппарате клеток опухолей HA-1 и LLC мышей. Дальнейшие эксперименты будут направлены на изучение молекулярных взаимодействий ТВР и выяснение пушкового механизма увеличения его количества в опухолях.

НАКОПЛЕНИЕ В СОСТАВЕ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК ФРАГМЕНТОВ ТРАНСКРИБИРУЕМОЙ ОБЛАСТИ РИБОСОМНОГО ГЕНА МОЖЕТ ПРОВОЦИРОВАТЬ АУТОИММУННЫЕ РЕАКЦИИ И БЫТЬ ПРИЧИНОЙ ГИБЕЛИ ЗАРОДЫША В РАННЕМ ЭМБРИОГЕНЕЗЕ.
© Н. А. Ляпунова, Н. Н. Вейко, С. В. Костюк, Е. А. Калашникова, Л. Н. Пороховник, Р. К. Агапова. ГУ Медико-генетический научный центр РАМН, Москва.

Фундаментальным свойством живой клетки является способность синтезировать белки, используя для этого универсальный механизм трансляции генетической информации с участием рибосом. Структурно-функциональную организацию рибосом обеспечивают рибосомные гены (РГ), представленные в геномах эукариот несколькими сотнями (иногда тысячами) копий. В диплоидном геноме человека содержится в среднем около 400 копий РГ, при варьировании в индивидуальных геномах — в пределах 250—670 копий. В соматических клетках транскрибируется только часть (около трети) молекул рДНК. Они могут быть выявлены в ядрышкообразующих районах (ЯОР) метафазных хромосом селективной окраской азотнокислым серебром (АгЯОР). Установлено, что размер АгЯОР пропорционален количеству активных копий РГ. Используя суммарный размер 10 АгЯОР (в усл. ед.) как меру количества активных РГ (АкРГ), мы определили дозу АкРГ в геномах 560 здоровых доноров в возрасте от рождения до более 90 лет: признак варьирует от 15.5 до 23.7 усл. ед., при среднем 19.44 усл. ед. и $\sigma = 1.72$. В имитационных скрещиваниях (8911 пар индивидуумов) было получено более 9 млн зигот, для которых среднее значение оказалось также 19.44 усл. ед., но признак варьировал от 5.6 до 30.2 ($\sigma = 2.55$). Это позволило высказать предположение о существовании стабилизирующего отбора, направленного на поддержание необходимого и достаточного для нормального функционирования клетки и организма количества РГ, и определить, что отбору подлежат 10.8 % зигот, в том числе элиминация геномов с количеством АкРГ менее 15.5 усл. ед. составила 6.1 %, а менее 23.7 — 4.7 %. Естественно, возник вопрос: какие механизмы определяют гибель зигот (или эмбрионов)? В отношении отсева зигот с малой копийностью РГ с достаточным

основанием можно предположить, что клетке требуется определенный минимум рибосом, способный обеспечить синтез необходимого количества белка. Вопрос о причинах элиминации зигот с высокой копийностью РГ оставался без ответа. В последнее время нами обнаружена новая, неизвестная до сих пор иммуностимулирующая роль ДНК транскрибируемой области (ТО) рибосомного гена (Вейко и др. Бюл. эксперим. биол. мед., 2006, **142**(9): 282—295; **142**(10): 409—413). Известно, что при инфекции или вакцинации бактериальная ДНК, содержащая неметилированные (нм) CpG-мотивы, попадая в кровь, взаимодействует с определенными рецепторами компетентных клеток (Toll-like receptor — TLR9), стимулируя их иммунный ответ (Klinman, 2004). Однако при циркуляции в крови больших количеств нмCpG-ДНК в организме развиваются тяжелые аутоиммунные нарушения (Viglianti, 2003). Тотальная ядерная ДНК, неизбежно попадающая в кровяное русло в результате апоптоза клеток, не обладает иммуномодулирующим действием из-за низкого содержания нмCpG-ДНК. Ранее в наших работах показано, что фрагменты ТОрДНК избирательно накапливаются во внеклеточной среде вследствие устойчивости к возникновению двухнитевых разрывов при накоплении одонитевых, вносимых нуклеазами (Вейко, Спитковский, 2000). При этом на протяжении 13.3 т. п. н. в ТОрДНК содержится более 200 нмCpG-мотивов, способных взаимодействовать с рецепторами типа TLR9. Заметим, что в нетранскрибируемом спейсере рДНК (около 30 т. п. н.) содержится всего 30 похожих мотивов, что близко к геномной ДНК в целом. Обогащенность внДНК фрагментами ТОрДНК особенно выражена у пациентов с ревматоидным артритом — аутоиммунным заболеванием, для патогенеза которого характерен высокий уровень апоптоза. В опытах *in vitro* нами показано, что в присутствии фрагментов ТОрДНК (0.2 и 2.0 мкг в 1 мл среды, 4 и 24 ч) выделенные лимфоциты человека в десятки раз увеличивают продукцию ИЛ-6 и в 3—4 раза — ФНО- α (Вейко и др., 2006; Калашникова и др., 2006). Исходя из того что ранний эмбриогенез сопровождается апоптозом клеток зародыша и прилежащих тканей, мы высказали предположение о том, что при избыточном содержании РГ в геномной ДНК в межклеточном пространстве эмбриона может оказаться высокое содержание нмCpG-мотивов, которые спровоцируют аутоиммунные процессы, способные привести к гибели эмбриона и, следовательно, быть причиной стабилизирующего отбора. Предложенная гипотеза нуждается в экспериментальной проверке.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-48101).

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПОВЕДЕНИЯ ЛИМФОЦИДНЫХ КЛЕТОК, ИХ ЯДЕР И ЯДРЫШЕК ПРИ ПЕРИОДИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ И ЛЕЙКОЗЕ. © Ю. А. Магакян, Е. М. Каралова, Л. О. Аброян, Л. А. Акопян. Отдел физико-химической биологии клетки ИМБ НАН Республики Армения, Ереван.

Методами цитоморфологии, цитоморфометрии, количественной цитохимии и цитофотометрии исследовали популяцию лимфоцитов у клинически здоровых людей (доноров) и пациентов в процессе развития периоди-

ческой болезни (ПБ) и лейкоза. Сравнительный анализ показал, что различия между донорами и больными ПБ выявляются уже на уровне состава лимфоидной популяции. В крови больных обнаруживаются бластные формы. У доноров они отсутствуют. В период ремиссии бласты составляют 4—6 %, во время приступа их число возрастает до 6—10 %, максимума их количество достигает при переходе болезни в амилоидоз (16—20 %). Появление незрелых форм является отражением реакции иммунной системы на необходимость быстрого пополнения популяции. Высокая реактивность лимфоцитов проявляется и на уровне субклеточных структур. Повышается содержание ДНК в ядрах, особенно в период амилоидоза. Изменяется объем ядер: у больных даже во время ремиссии он в 1,5 раза больше, чем у доноров, остается более высоким в период приступа и резко возрастает при амилоидозе. Площадь поверхности ядер находится в прямой корреляции с их объемом. Изменения в параметрах ядер находят отражение в степени активности ядрышек. У здоровых людей не во всех ядрах выявляются ядрышки: в среднем на ядро приходится менее 1 ядрышка. У больных же во всех ядрах имеются ядрышки, число их выше единицы даже в период вне приступа, объем и площадь поверхности также выше, чем у доноров, особенно во время амилоидоза. Выявлены различия и в распределении ядер по числу ядрышек. У больных вне приступа 80—90 % составляют клетки с 1—2 ядрышками, 10—14 % приходится на клетки с 3 ядрышками, у некоторых больных были обнаружены ядра с 4 ядрышками и более. Во время амилоидоза резко уменьшается число одно- и двуядрышковых ядер и возрастает число клеток с ядрами, содержащими 3—6 и даже 8 ядрышек. При остром лейкозе, как и при ПБ, в крови выявляются лимфобласты (20 %), большая часть популяции представлена пролимфоцитами (48 %) и лимфоцитами (32 %). В костном мозге доля лимфобластов составляет 42—50 %, пролимфоцитов — 28—42, лимфоцитов — 16—22 %. В период ремиссии соотношение клеток в крови меняется в пользу лимфоцитов (46 %), численность пролимфоцитов остается на том же уровне (50 %), доля лимфобластов сокращается до 4 %. В костном мозге число пролимфоцитов и лимфобластов уменьшается (22 и 34 %), доля лимфоцитов достигает 44 %, выравниваясь с их числом в крови. Появление при лейкозе незрелых форм в крови вызвано необходимостью, как и при ПБ, быстрого восстановления в ней численности клеток. Сравнение лимфоидных популяций при ПБ и лейкозе выявило сходные черты в их поведении, но наблюдаются и существенные различия. При остром лейкозе объем и площадь поверхности ядер значительно выше, чем при ПБ, и поскольку именно эти параметры характеризуют возможности обмена метаболитами и информацией между ядром и цитоплазмой, постольку можно полагать, что при остром лейкозе активность этого обмена в несколько раз выше, чем при ПБ. При лейкозе в среднем на ядро приходится меньше 1 ядрышка, что могло бы свидетельствовать о меньшей их активности по сравнению с ПБ, если бы не значения объема и площади поверхности ядрышек, которые, как и в случае с ядрами, значительно выше, чем при ПБ. При ПБ во время приступа и в период амилоидоза в ядрах происходит увеличение массы ДНК, не кратное 2с. Параллельное нарастание числа ядрышек позволяет полагать, что это может быть проявлением амплификации локуса гена *MEFV*, ответственного за синтез специфического белка пирин, экспрессия ко-

торого определяет переход ПБ в амилоидоз. При остром лейкозе реализуется иной механизм гиперрепликации. Лимфобласты, накопив в S-фазе 4с ДНК, временно блокируются в фазе G₂, а затем делятся и превращаются в зрелые клетки. Подобный механизм быстрого пополнения численности эритроцитов в крови при острой анемии был открыт нами давно и назван резервным эритропоэзом. По аналогии описанный выше процесс мы назвали «резервным» лимфопоэзом.

ВОЗМОЖНОЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЪЯСНЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА БЕЛКА S100A11 В ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩИХСЯ МИОБЛАСТАХ ЧЕЛОВЕКА. © А. А. Макаров,¹ Л. И. Ковалев,¹ И. Ю. Торпыгин,² С. С. Шишкин.¹ ¹ Институт биохимии РАН, amkrv@mail.ru, и ² Научно-исследовательский институт биомедицинской химии РАМН, Москва.

Кальцийсвязывающий белок S100A11, ранее считавшийся характерным для гладкомышечной ткани, в настоящее время идентифицирован в клетках с различными типами дифференцировки, в частности в эпителиальной ткани различных органов и в фибробластах. В то же время в поперечнополосатой мышечной ткани данный белок присутствует в крайне незначительном количестве. Поэтому представляет особый интерес изучение количественной динамики этого белка в миобластах — способных к пролиферации одноядерных клетках скелетной мускулатуры. Фибробласты и скелетно-мышечные миобласты человека культивировали в среде F-12, содержащей пируват натрия, гентамицин и 12,5 % эмбриональной телячьей сыворотки. Дифференцировку миобластов индуцировали культивированием в среде, содержащей 2 % лошадиной сыворотки, в течение 2—8 сут со сменной среды каждые 2 сут. Белки, выделенные из миобластов и фибробластов, фракционировали методом двумерного электрофореза в полиакриламидном геле по О'Фарреллу. Детекцию белков проводили с помощью красителя Кумасси R-150 и азотнокислого серебра, что позволяло выявлять до нескольких сотен белковых фракций на одной электрофореграмме. Идентификацию белков проводили методом MALDI-TOF масс-спектрометрии с использованием пакета программ Mascot и базы данных NCBI Protein. Было выявлено, что в пролиферирующих миобластах белок S100A11 представлен в значительном количестве, в то время как в фибробластах, белковый спектр которых близок к таковому миобластов, количество этого белка невелико. Культивирование миобластов в дифференцировочной среде сопровождается выраженным уменьшением количества данного белка, что представляется закономерным процессом, поскольку для высокодифференцированной скелетной мышечной ткани характерно отсутствие этого белка. Следует отметить, что на примере фибробластов было показано, что экспрессия этого белка резко снижается после иммортализации клеток (Sakaguchi et al., 2000). Это подтверждается и тем, что данный белок не был обнаружен в иммортализованных миобластах линии C2C12 (Tannu et al., 2004; Kislinger et al., 2005). На примере рака мочевого пузыря показано, что снижение экспрессии этого белка коррелирует со способностью опухоли к инвазии в окружающие ткани (Memon et al., 2005). В клетках гепатоцеллюлярной карциномы белок S100A11 участвует в передаче подавляющего пролиферацию сигнала от трансфор-

мирующего фактора роста бета (Miyazaki et al., 2004). В то же время результаты ряда работ показывают, что уровень экспрессии S100A11 в ряде опухолей тканей выше, чем в неопухолевых тканях (Cross et al., 2005; Melle et al., 2006). Проллиферирующие миобласты отличаются крайне высокой «доброкачественностью», опухоли скелетной мускулатуры — как доброкачественные, так и злокачественные — встречаются крайне редко. Развитие же этих опухолей в младенческом и детском возрасте можно объяснить происхождением их из других клеток-предшественников (фетальных миобластов). Можно полагать, что высокий уровень экспрессии S100A11 в пролиферирующих миобластах объясняется необходимостью обеспечить быстрый переход этих клеток в покоящееся состояние во время регенерации скелетной мышцы. В то же время у дифференцированных миобластов, не вступающих в клеточный цикл, необходимость в подобном белке отсутствует, что выражается в крайне низком уровне его экспрессии.

ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОЙ ИНДУКЦИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ В КАРДИОМИОЦИТАРНОМ НАПРАВЛЕНИИ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА. © Ю. В. Маленьких,¹ С. А. Александрова,² Н. С. Николаенко,² Г. П. Пинаев.²
¹ С.-Петербургский государственный политехнический университет и ² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Несмотря на проведение большого количества работ по дифференцировке стромальных клеток костного мозга (СККМ) в разных направлениях, еще не подобраны оптимальные условия для их направленной дифференцировки в кардиомиоциты *in vitro*. В некоторых работах было отмечено появление пульсирующих клеток, сходных по своим морфологическим признакам с кардиомиоцитами, однако формирования мышечных фибрилл и терминальной дифференцировки показано не было. В настоящей работе проводили сравнение двух вариантов индукции дифференцировки СККМ в кардиомиоцитарном направлении. Специфическим химическим индуктором являлся 5'-азоцитидин. В первом варианте индукции СККМ в концентрации $1.3 \cdot 10^3$ клеток в 1 см^2 высевали в среду, содержащую 20 % сыворотки эмбрионов коров (ЭСК) и 3 мкМ 5'-азоцитидина. Во втором варианте индукции СККМ в концентрации $2 \cdot 10^4$ клеток в 1 см^2 культивировали в среде, содержащей 2 % ЭСК, 3 мкМ 5'-азоцитидина, эпидермальный фактор роста, фактор роста тромбоцитов, а также ряд дополнительных факторов, способствующих поддержанию жизнедеятельности клеток в условиях низкого содержания сыворотки. В обоих случаях обработку клеток индуцирующей средой осуществляли в течение 2 нед, смену среды проводили каждые 3—4 сут культивирования. Дифференцировку оценивали по выявлению в клетках гликогена с помощью ШИК-реакции, экспрессии специфических генов-маркеров кардиомиоцитов Gata 4 и Cx43 методом ОТ-ПЦР и по появлению и локализации белков, входящих в состав миофибрилл кардиомиоцитов (миозина II, α -актинина и тропонина I) методом непрямой иммуофлуоресценции. Через 2 нед культивирования при обоих вариантах индукции наблюдалась специфическая агрегация клеток, в отдельных клетках выявлялись гликоген и гликозилированные белки, были отмечены увеличение

экспрессии генов-маркеров кардиомиоцитарной дифференцировки и появление в отдельных клетках белков миофибрилл кардиомиоцитов. Количество клеток, окрашенных специфично на гликоген или мышечные белки, а также интенсивность экспрессии генов-маркеров кардиомиоцитарной дифференцировки варьировали значительно при разных вариантах индукции. Так, при индукции в среде с низким содержанием сыворотки интенсивность экспрессии генов Gata 4 и Cx43 увеличивалась в 2—3 раза, а суммарная интенсивность свечения белков миозина II, α -актинина и тропонина I — в 4—5 раз по сравнению с контрольными клетками, не подвергавшимися обработке индукторами. В то же время при индукции с высоким содержанием сыворотки экспрессия изучаемых генов увеличилась незначительно или совсем не увеличилась, как и суммарное свечение миофибриллярных белков. Однако в обоих случаях не было выявлено формирования миофибрилл, характерных для мышечных клеток сердечной ткани. Пока неясно, возможно ли создание таких сложных тканевых структур, как миокард, в трехмерной системе *in vitro*; тем не менее результаты нашей работы показали, что в данных условиях культивирования СККМ способны дифференцироваться в кардиомиоцитарном направлении, и позволили выбрать наиболее оптимальные условия для специфической направленной дифференцировки.

ШАПЕРОН Hsp70 ПО ТУ И ДРУГУЮ СТОРОНЫ КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНЫ: РАЗНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ, НО ОДНА ФУНКЦИЯ. © Б. А. Маргулис. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Открытие шаперонов в 1980-е годы стало важным приобретением науки: оно позволило объяснить, как в эукариотической клетке в условиях молекулярного столпотворения могут функционировать тысячи механизмов, состоящих из белков. По определению, шапероны замечают неправильные с их точки белки и пытаются исправить конформационные дефекты или способствуют элиминации необратимо поврежденных полипептидов. Очевидно, что такой полифункциональный шаперон, как Hsp70, необходим любой клетке практически во всех проявлениях ее жизнедеятельности. Установлено, и на эту тему написаны тысячи статей и монографий, что Hsp70 способен защищать клетки и организм от воздействия разнообразных цитотоксических и патогенных факторов. Механизм такой защитной функции не вполне ясен, и наиболее принятой является точка зрения о том, что Hsp70, используя собственный шаперонный потенциал, захватывает молекулы, участвующие в передаче апоптозного сигнала, и подавляет их активность. Такой механизм действия внутриклеточного Hsp70 доказан. Накопленная в течение последних нескольких лет масса данных позволяет сделать вывод о том, что под действием различных стрессовых факторов клетки выпускают Hsp 70 в среду (или кровотока) и экспортируемый шаперон способен активировать клетки системы врожденного иммунитета через рецепторы TLR2/4. Подобная реакция иммунных клеток обычно приводит к повышению устойчивости всего организма к действию поражающих факторов, таких, например, как бактериальная контаминация. Таким образом, Hsp70 выполняет защитную функцию независимо от того, где — внутри или снаружи клетки — он находится; однако механизмы действия

белка различны. В докладе обсуждаются вопросы использования эффектов шаперона Hsp70 в терапии онкологических и вирусных патологий человека.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА МЕЗОГЕЛИНА В РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ КЛЕТОК МЕДУЗЫ *Aurelia aurita*. © И. В. Мамвеев. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Жизненный цикл *Aurelia aurita* состоит из четырех стадий: личинки (планулы), полипоидной стадии, эфиров и медузы. Тело представителей этого вида, как и у других кишечнополостных, образовано двумя эпителиальными пластами, эпидермой и гастродермой, между которыми находится мезоглея с мезоглеальными клетками (МК). Происхождение МК в онтогенезе слабо изучено. С помощью электрофоретического анализа белкового состава мезоглеи зрелых медуз показали наличие в ней нескольких мажорных белков. Одним из них является белок с мол. массой 45/47 кДа. Мы получили поликлональные антитела против белка 45/47 кДа и подтвердили их специфичность с помощью иммуоблота. Иммуоистохимический анализ срезов показал, что антиген 45/47 кДа локализуется в гранулах МК и в апикальной части клеток эпидермы, а у зрелых медуз он выявляется также в составе эластических волокон. Следовательно, МК *A. aurita* (наряду с эпидермальными клетками) определенно участвует в процессах формирования межклеточного вещества мезоглеи. Встала задача определить нуклеотидную последовательность мРНК мажорного белка мезоглеи *A. aurita* с мол. массой 45/47 кДа. Белковое секвенирование проведено в Центре белковых ресурсов Рокфеллеровского университета (США). Нуклеотидную последовательность частично вырожденных гнездовых праймеров, специфических к пептиду, генерировали с помощью программы CodeNore (Rose et al., 2003). Праймеры использовали для 5'- и 3'-RACE ПЦР. Полученный ПЦР-продукт клонировали и секвенировали. Белковое секвенирование по Эдману пептидов, полученных из белка 45/47 кДа трипсинолизом, дало 4 аминокислотные последовательности: DDAQGHYTCNADE, DSXYSNAH, YTFIENR и CTSGCEGNNI. Сравнение полученных последовательностей с белками в базах данных показало, что пептиды не принадлежат ни одному из известных белков. Клонирование мРНК этого белка дало нуклеотидную последовательность длиной 1421 п. н. Последовательность содержит открытую рамку считывания длиной 1249 п. н. и вариант сигнала полиаденилирования (ATTAАА) на 18 п. н. выше поли-А-последовательности на 3'-конце. Теоретическая транскрипция открытой рамки считывания дает гипотетический белок длиной 416 аминокислотных остатков и с расчетной мол. массой 47 223 Да (ProtParam). Все 4 аминокислотные последовательности пептидов содержатся в последовательности гипотетического белка. Сравнение последовательности гипотетического белка с последовательностями белков, содержащимися в базах данных, показало, что это новый белок. Мы назвали его мезоглеин. Последовательность мРНК мезоглеина размещена в базе данных GenBank (Accession Number DQ467654). Клонирована также мРНК мезоглеина, отличающаяся на 22 п. н. (GenBank Accession Number EF093532). В результате поиска известных доменов в гипотетической последовательности мезоглеина обнаружены домены Delta/Serrate/Lag-2 (DSL) и Zona Pelucida (ZP), а также 3 сайта узнавания

протеазы фурина (furin), 2 возможных сайта N-гликозилирования и 1 возможный сайт O-гликозилирования. Теоретическая кривая титрования имеет изоэлектрическую точку 9.03, что подтверждает предположение о положительном заряде мезоглеина, сделанное на основании гистохимических данных. Экспрессию мезоглеина определяли в эпидерме, гастродерме и мезоглее методом ОТ-ПЦР. Показано, что ПЦР-продукт ожидаемого размера наблюдается только в реакциях с РНК из мезоглеальных клеток. Среди 580 известных ZP-содержащих белков мезоглеин принадлежит низшему из таксонов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-49578-а).

БЕЛОК СЛИЯНИЯ ВИРУСА КОРИ ТРАНСПОРТИРУЕТСЯ В СИНАПСЫ НЕЙРОНОВ. © Н. Р. Махортова,^{1,2} Г. Ф. Ралл,² В. С. Прасолов.¹ ¹ Институт молекулярной биологии РАН, Москва, и ² Группа вирусного патогенеза Ракового центра Фокса Чейза, Филадельфия 19111, США.

Несмотря на существование вакцины, вирус кори (ВК) входит в первую десятку наиболее летальных патогенов и приводит к смерти около 1 млн человек ежегодно во всем мире в результате иммуносупрессии и по причине постинфекционных осложнений центральной нервной системы (ЦНС). Примерно у 1 из 19 тыс. пациентов, заболевших корью в год, развиваются осложнения в виде заболеваний мозга. Ряд особенностей этих заболеваний указывает на то, что механизм патогенеза ВК в ЦНС коренным образом отличается от инфекционного процесса на периферии и что причиной смерти является скорее нарушение функций нервных клеток, а не их гибель. Исходя из этого изучение особенностей патогенеза коревой вирусной инфекции в ЦНС является важной задачей биомедицины и может облегчить понимание многих других персистирующих заболеваний мозга, вызываемых нейротропными вирусами. При заражении клетки поверхностный гликопротеин частицы вируса кори — гемагглютинин (ГА) — связывается с одним из двух клеточных рецепторов — CD46 или SLAM, после чего другой вирусный гликопротеин — белок слияния (БС) — обеспечивает проникновение ВК в клетку. Приматы, обладая клеточными рецепторами CD46 и SLAM, являются единственными естественными хозяевами для ВК, поэтому для исследования механизмов патогенеза заболеваний ЦНС мы создали линию трансгенных мышей, у которых в нейронах экспрессируется рецептор CD46 под промотором гена нейрон-специфичной енолазы. Эксперименты *in vitro* с использованием первичной культуры CD46⁺-нейронов показали, что рецептор необходим лишь для первичного проникновения ВК в нейроны, тогда как дальнейшее распространение вируса происходит без его почкования и гибели нейронов и не зависит от наличия рецепторов CD46 или SLAM. Поскольку CD46⁺-нейроны способны заражаться при совместном культивировании с инфицированными CD46⁺-нейронами, мы предположили, что ВК-ГА не участвует в передаче вируса между нейронами. Целью данной работы являлось изучение процессов трансляции, формирования и транспорта ВК-БС в синапсы нейронов ЦНС. Для этого

была поставлена задача подтвердить наличие экспрессии и изучить локализацию БС-ВК в нейронах методом двойной иммунофлуоресценции. При одновременном окрашивании клеток, зараженных ВК, поликлональными антителами против антигенов ВК и моноклональными антителами против БС-ВК показано, что БС экспрессируется в нейронах наряду с другими вирусными гликопротеинами и распределен по всему нейрону, включая его отростки. По нашим предварительным наблюдениям, в зараженной культуре, антигены присутствуют в нейронах, соединенных отростками между собой, образуя «кластеры» инфекции. Поскольку распространение вируса по нейронам происходит без отпочковывания частиц ВК, предположили, что вирусный транспорт осуществляется через синапс. Для анализа присутствия БС в синапсах нервных клеток проверили наличие колокализации БС-ВК и белка синаптофизина. Синаптофизин является маркером синапсов, поскольку готовые к выбросу пресинаптические везикулы с нейромедиаторами экспрессируют этот белок на поверхности. Показали, что БС-ВК присутствует в теле зараженных нейронов, транспортируется вдоль всех отростков нейронов и концентрируется в области синапсов. Известно множество примеров, когда вирусы используют клеточный цитоскелет и везикулярный транспорт для распространения по ЦНС. Основываясь на полученных нами данных, мы предполагаем, что БС-ВК транспортируется по отросткам из зараженного нейрона в соседний, еще не зараженный нейрон, через синапсы, возможно с использованием аксонального транспорта.

ХРОМОСОМНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ ГЕНОВ-МАРКЕРОВ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ И ИХ ЭКСПРЕССИЯ В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ АМЕРИКАНСКОЙ НОРКИ *Mustela vison*. © А. Г. Мензоров,¹ Т. Е. Любая,² М. М. Грдина,¹ О. Л. Серов.^{1,2} ¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, и ² Новосибирский государственный университет, menzovog@bionet.nsc.ru.

Американская норка — представитель семейства Mustelidae. В настоящее время активно ведутся работы по построению генетической карты этого вида и локализации генов окраски. В нашей лаборатории были получены плюрипотентные эмбриональные стволовые (ЭС) клетки американской норки (Sukoyan et al. Mol. Reprod. Develop., 1993. 36: 148—158). Данная работа посвящена молекулярной характеристике линий ЭС клеток MES-12, MES-12^{neo} и MES-13. *Oct-4*, *Sox-2* и *Nanog* — гены-маркеры плюрипотентности. Активность этих генов необходима для нормального развития эмбриона и поддержания плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток мыши и человека. *Oct-4*, *Sox-2* и *Nanog* считаются основными факторами транскрипции в иерархии регуляторных факторов, ответственных за плюрипотентность. Они влияют на экспрессию других транскрипционных факторов, а также регулируют экспрессию друг друга, формируя регуляторную транскрипционную сеть (Vouer et al. Cell, 2005, 122: 947—956). Целью данной работы является изучение экспрессии генов *Oct-4* и *Sox-2* в трех линиях ЭС-клеток американской норки и их хромосомной локализации. Нами были определены первичные структуры фрагментов генов американской норки *Oct-4*, *Sox-2* и β -actin длиной 471, 263 и 502 п. н. соответствен-

но. Впервые с помощью панели гибридных клонов американская норка—китайский хомячок (Kuznetsov et al. J. Heredity, 2003, 94: 386—391) гены *Oct-4*, *Sox-2* и β -actin локализованы со 100%-ной конкордантностью на хромосомах 1, 6 и 5. Методом ОТ-ПЦР показана экспрессия гена *Oct-4* в линиях ЭС-клеток норки MES-12, MES-12^{neo} и MES-13. Для подтверждения данных ОТ-ПЦР был проведен иммунофлуоресцентный анализ, который выявил присутствие *Oct-4* и *Nanog* в линиях ЭС-клеток MES-12 и MES-13. Экспрессия маркеров плюрипотентности подтверждает высокий потенциал исследованных линий ЭС-клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке по программе фундаментальных исследований президиума РАН (грант № 11.7).

РОЛЬ ВИМЕНТИНОВЫХ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ФИЛАМЕНТОВ В РЕГУЛЯЦИИ ПОДВИЖНОСТИ МИТОХОНДРИЙ. © А. А. Минин,¹ О. Е. Некрасова.² ¹ Институт белка РАН, Пущино, alexminin@gmail.com, и ² Институт биологии развития, Москва.

Правильное распределение митохондрий имеет большое значение для их функции и достигается благодаря взаимодействию этих органелл с цитоскелетом. На большие расстояния митохондрии перемещаются по микротрубочкам, а по актиновым микрофиламентам — на короткие расстояния. Кроме того, они прикрепляются к определенным структурам актинового цитоскелета в процессе «заякоривания», но молекулярные основы этих взаимодействий мало изучены. Описаны случаи, когда роль в обеспечении связи различных клеточных структур и органелл между собой играют промежуточные филаменты (ПФ). Чтобы исследовать возможное участие ПФ в прикреплении митохондрий к цитоскелету, мы анализировали движение этих органелл в фибробластах, полученных из мышцы, лишённой гена виментина. Наши данные свидетельствуют о том, что подвижность митохондрий в таких клетках, не содержащих ПФ, значительно выше, чем в клетках дикого типа или в клетках с восстановленными ПФ в результате экспрессии экзогенного виментина. Интересно, что подвижность митохондрий в клетках, лишённых виментина, не увеличивалась при разрушении фибриллярного актина (ФА) латранкулином Б в отличие от клеток, содержащих ПФ. Это указывает на участие ПФ во взаимодействии митохондрий с ФА. Ранее мы обнаружили, что активация протеинкиназы С (РКС) при помощи форболового эфира приводит к сильному увеличению подвижности митохондрий, в то время как ингибирование этого фермента вызывало полную их остановку. В этой работе нам удалось показать, что форболовый эфир увеличивает подвижность митохондрий даже в клетках с разрушенным ФА, но не влияет на нее в клетках без ПФ. На основе этих данных мы делаем вывод о том, что РКС регулирует взаимодействие митохондрий с ПФ. Таким образом, мы обнаружили, что виментиновые ПФ взаимодействуют с митохондриями и регулируют их подвижность в клетках, а также то, что эта функция ПФ находится под контролем РКС.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 06-04-48452-а), фондом CRDF (грант

RB1-2506-PU-03) и по программе президиума РАН «Молекулярная биология».

ВЫЖИВАНИЕ КАРДИОМИОЦИТОВ И РЕПАРАЦИЯ ДНК ПОСЛЕ ДИНАМИЧЕСКОГО СТРЕССА У МЫШЕЙ. © В. М. Михайлов, И. В. Веженкова, В. И. Казаков, С. А. Комаров, В. К. Нилова, В. Д. Жестяников, Г. Е. Савельева. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

До настоящего времени не определено, является ли популяция кардиомиоцитов млекопитающих обновляющейся клеточной популяцией. Основную массу органа составляют терминально-дифференцированные кардиомиоциты. Появляющиеся в литературе данные о присутствии в миокарде млекопитающих стволовых клеток кардиомиоцитов не отрицают, однако того факта, что основными причинами развивающейся функциональной недостаточности миокарда являются потеря кардиомиоцитов и развитие кардиомиопатии. Независимо от решения вопроса о природе популяции кардиомиоцитов основным фактором, определяющим функционально-приспособительные свойства миокарда, является выживание терминально дифференцированных кардиомиоцитов. Целью работы стало изучение цитологических и молекулярных механизмов выживания кардиомиоцитов мышей после динамического стресса. Объектом исследования был желудочковый миокард мышей C57BL/6 и мутантных мышей mdx, дефектных по синтезу дистрофина. В качестве динамического стресса (ДС) применили 5-минутное плавание в воде при 12 °С; использованными методами исследования были световая и электронная микроскопия, морфометрическая оценка концентрации клеток в 1 мм³ миокарда и удельной плотности митохондрий, выявление в миокарде как среднемолекулярных, так и низкомолекулярных фрагментов ДНК при электрофорезе в ПААГ и при использовании терминальной трансферазы, а также иммуноморфологическая регистрация двухнитевых разрывов (ДР) ДНК при помощи антител к фосфорилированной форме гистона H2Ах (гистон γ -H2Ах). Было обнаружено, что у мышей mdx при обычных условиях содержания в миокарде обнаружены такие признаки апоптоза, как постоянное присутствие фрагментов ДНК размером 65 тыс. пар нуклеотидов, отсутствие низкомолекулярного распада ДНК, наличие в водно-солевом экстракте миокарда фактора (эндонуклеазы), фрагментирующего ДНК *E. coli*, и сниженная удельная плотность митохондрий с 0.329 ± 0.018 до 0.274 ± 0.016 по сравнению с кардиомиоцитами мышей C57BL/6. У мышей mdx микроскопический апоптоз кардиомиоцитов идентифицировался крайне редко. Таким образом, кардиомиоциты мышей mdx постоянно находятся на начальной стадии апоптоза, избегая вступления в деструктивную стадию апоптоза, которая развивается после ДС. Появление низкомолекулярного распада ДНК после ДС в миокарде мышей mdx и C57BL/6 указывает на возникновение ДР ДНК. Присутствие в ДНК миокарда ДР ДНК было подтверждено иммуноморфологически при помощи антител к гистону γ -H2Ах. Через 1 ч после ДС доля ядер с позитивной окраской на гистон γ -H2Ах возрастала у мышей mdx с 5.3 ± 1 до 50 ± 6 %, у мышей C57BL/6 — с 0.05 до 1.0 ± 0.2 %. Ядра кардиомиоцитов составляли основную часть меченных анти-H2Ах-сывороткой ядер клеток миокарда: кардиомиоцитами

были в 80 ± 1 % перед ДС и в 80 ± 7 % через 1 ч после ДС среди всех меченых ядер. Через 24 ч доля γ -H2Ах-положительных ядер в миокарде мышей mdx падала до 9.2 ± 0.3 %, у мышей C57BL/6 — до 0.1 %. Концентрация клеток в миокарде мышей mdx уменьшалась на 2.9 ± 0.3 %, в том числе и концентрация кардиомиоцитов на 2.8 %; в миокарде мышей C57BL/6 зарегистрировать достоверные изменения не удалось. Сделан вывод о том, что при обычном содержании животных кардиомиоциты мышей mdx постоянно находятся на начальной стадии апоптоза. Они же являются основной мишенью для ДС, после которого ДР ДНК были зарегистрированы примерно у 45 % кардиомиоцитов. Через 24 ч потеря кардиомиоцитов в миокарде мышей mdx составила 2.8 %. Миокард мышей C57BL/6 также отвечает на ДС появлением низкомолекулярного распада ДНК и образованием ДР ДНК. Однако повреждение ДНК и гибель кардиомиоцитов не определяются через 24 ч после ДС. Полученные данные указывают на участие репарации ДНК в выживании кардиомиоцитов мышей после динамического стресса.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 05-04-49609, 02-04-49870, 99-04-49583 и 97-04-48764).

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА GL-6. © Г. Р. Михайлова, Р. Я. Подчерняева. ГУ Научно-исследовательский институт вирусологии РАМН, Москва.

В данной работе представлены результаты цитогенетического исследования глиобластомы человека линии GL-6(251-MG) после длительного хранения в жидком азоте. Указанная линия была получена в 1968 г. в Лаборатории культур тканей г. Упсала (Швеция) из клеток, полученных из Отдела вирусологии Государственной бактериологической лаборатории (Стокгольм, Швеция). Наряду с исходной линией GL-6 нами были исследованы 2 варианта этой линии: 1) клетки, 20 лет хранившиеся в жидком азоте и после размораживания прошедшие 2 пассажа; 2) клетки, хранившиеся в жидком азоте 25 лет, после размораживания находившиеся 2 нед в лаг-фазе без пересева, но со сменой среды, затем пассированные 7 раз; после этого клетки были повторно заморожены и после размораживания прошли 2 пассажа. Для цитогенетического исследования 48-часовую культуру клеток подвергали воздействию 0.02%-ного раствора колхицина в течение 2—3 ч, снимали с субстрата версеном с химопсином, обрабатывали 12 мин гипотоническим раствором (0.5 % KCl), центрифугировали и фиксировали осадок 3 раза метиловым спиртом с ледяной уксусной кислотой (3 : 1). Суспензию фиксированных клеток наносили на охлажденные предметные стекла, окрашивали азуром—эозином по Романовскому, промывали, высушивали и изучали под микроскопом с увеличением об. 100× им., ок. 10×. В исходной линии модальный класс составляли клетки с 64—66 хромосомами при разбросе числа хромосом 51—68, доля полиплоидных клеток (11—127 хромосом) была 6 %. Исследования изоферментов этой линии показали наличие Г-6-ФДГ медленного В-типа и PGM₁ 1-го типа. Данная линия не контаминирована клетками линии HeLa: маркерных хро-

мосом клеток HeLa не обнаружено. После содержания культур в жидком азоте модальный класс составляли клетки с 63—65 хромосомами, число хромосом варьировало в пределах 54—70, что несущественно отличалось от данных для исходной линии. Основное различие вариантов культур заключалось в значительном увеличении количества полиплоидных клеток (100—200 хромосом) до 29 % среди клеток, хранившихся в жидком азоте 20 лет, и до 16 % среди клеток, хранившихся в жидком азоте 25 лет. Помимо этого, в обоих вариантах наблюдались патологические изменения хромосом. В полиплоидных клетках наблюдались эндоредупликация хромосом, их распыление, образование дигцентрических хромосом, пробелов и фрагментов. При дальнейшем пассировании культур GL-6 обоих вариантов происходила частичная дегенерация полиплоидных клеток.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДЕЙСТВИЯ ФАКТОРОВ РОСТА НА МЕЗЕНХИМНЫЕ РОДОНАЧАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ КОСТНОГО МОЗГА И ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ IN VITRO. © *Е. А. Молчанова, Е. И. Брагина, Э. И. Буеверова.* Институт биологии развития РАН, Москва, molchanova_jane@mail.ru.

Известно, что факторы роста оказывают влияние на процессы самоподдержания, пролиферации, миграции и дифференцировки мезенхимных родоначальных клеток (МПК) костного мозга. Наиболее значительные эффекты на эти клетки *in vitro* оказывают такие факторы, как EGF (эпидермальный фактор роста), bFGF (основной фактор роста фибробластов) и PDGF (фактор роста, выделенный из тромбоцитов). Большое количество работ по исследованию действия этих факторов на МПК выявляет противоречие в результатах. Целью нашей работы был сравнительный анализ действия EGF, bFGF и PDGF на две популяции клеток, полученных из костного мозга половозрелых крыс и эмбриональной печени зародышей на 17-е сут пренатального развития (период активного кроветворения). МПК из обоих источников обладают широкими потенциями к пролиферации и дифференцировке; кроме того, эти клетки могут иметь общее происхождение и представлять собой единую популяцию клеток, мигрирующих из одних кроветворных органов в другие в ходе онтогенеза. Сравнительное исследование влияния ростовых факторов на МПК эмбриональной печени и костного мозга взрослых животных должно помочь понять, какие изменения эти клетки претерпевают в ходе онтогенеза, и получить новые данные об их функциональных особенностях. В работе было проанализировано влияние факторов на количество образуемых МПК колоний (эффективность клонирования), размеры колоний, а также на потенции клеток к остеогенной дифференцировке. Были выявлены как сходства, так и некоторые различия по чувствительности популяций к исследуемым факторам. Действие PDGF (2.5 нг/мл) не приводило к значительным изменениям как числа, так и размеров образуемых МПК колоний. Однако на рост колоний из эмбриональной печени фактор оказывал небольшую стимуляцию. В концентрации 10 нг/мл действие bFGF приводило к различным ответам клеток костного мозга и эмбриональной печени. Получили, что данный фактор подавляет клоногенный рост КОЕ-Ф из костного мозга. В случае с клетками из эмбриональной печени наблюдали стимулирующее действие данного

фактора — увеличивалась доля более крупных по площади колоний. EGF (1 нг/мл) действовал на МПК костного мозга и эмбриональной печени сходным образом — увеличивал число образуемых колоний и вызывал достоверное увеличение их размеров. Популяция МПК костного мозга значительно превосходила соответствующую популяцию клеток эмбриональной печени по содержанию остеогенных предшественников, что было продемонстрировано в работе с помощью гистохимического выделения специфического маркера — щелочной фосфатазы (ЩФ). Влияние факторов на остеогенные потенции клеток исследуемых популяций выявляло ряд различий. EGF вызывал увеличение числа остеогенных клеток в популяции МПК, полученной из костного мозга. В отличие от костномозговых МПК из эмбриональной печени под действием EGF не выявляли значительного изменения остеогенного потенциала. bFGF вызывает снижение числа остеогенных предшественников в популяции МПК, выделенной из костного мозга, и не меняет потенций к остеогенезу клеток из эмбриональной печени. Действие PDGF не оказывает влияния на остеогенные потенции клеток из обоих источников. Таким образом, две популяции МПК, полученные из разных источников, выявляют дифференциальную чувствительность к исследованным факторам роста EGF, bFGF и PDGF, а также значительные различия в потенциях к остеогенезу.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-48209) и программы фундаментальных исследований президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

ОСОБЕННОСТИ СОСТОЯНИЯ БЕЛКОВ ЯДРЫШКА В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ С РАЗНЫМ УРОВНЕМ ТРАНСКРИПЦИИ РИБОСОМНЫХ ГЕНОВ. © *А. А. Моралева, М. В. Мальшева, А. В. Зубрицкий, А. А. Григорьев, М. А. Ползиков.* Институт биоорганической химии РАН, Москва.

В пролиферирующих клетках млекопитающих основную массу ядрышка составляют белки. Согласно последним данным масс-спектрометрического анализа, в ядрышке клеток HeLa человека содержится около 700 белков, большинство которых представлено факторами, участвующими в транскрипции рибосомных генов, процессинге новообразованных транскриптов пре-рРНК и сборке рибосомных частиц. Однако свойства и состав ядрышковых белков изменяются в ответ на подавление транскрипции хроматина как за счет миграции белков в нуклеоплазму, так и за счет «вхождения» в ядрышки специфических белков ядра (Andersen et al., 2005). Основная цель настоящей работы — изучение локализации и содержания трех основных белков ядрышка — Surf-6 (предположительно участвует в процессинге рибосомной рРНК и регуляции клеточного цикла), B23-нуклеофозмина (основной фактор сборки рибосомных частиц) и UBF (специфический кофактор РНК-полимеразы I), а также ядерного маркера клеточной пролиферации — белка PCNA — в фазах клеточного цикла, различающихся по уровню транскрипции. Объектами исследования служили фибробласты мыши линии NIH/3T3, синхронизированные в периодах G₀, G₁, S и G₂ в бессывороточной среде, Т-лимфоциты селезенки мыши, активированные к пролиферации конканавалином А, и лим-

фоциты периферической крови человека, активированные к пролиферации фитогемагглютинином. Анализ проводили методами иммунофлуоресценции и иммуноблотинга с использованием специфических антител к белкам. Активацию клеток оценивали методом проточной цитофлуориметрии после окрашивания ДНК иодидом пропидия в присутствии РНКазы. А. Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы. Содержание всех проанализированных белков — SURF-6, B23-нуклеофозмина, UBF, а также PCNA — уменьшается в клетках G_0 -периода по сравнению с пролиферирующими клетками вне зависимости от видовой или тканевой принадлежности клеток. Активация пролиферации приводит к увеличению размеров ядрышек и накоплению в них всех исследуемых белков, хотя изменения в содержании белков следуют разной динамике. Так, несмотря на многократное увеличение числа мест локализации UBF в ядрышках, его количество в суммарных клеточных лизатах лишь незначительно увеличивается при активации пролиферации лимфоцитов селезенки. Уровень Surf-6 прогрессивно возрастает вплоть до 48 ч активации лимфоцитов, но затем уменьшается к 72 ч, что, вероятно, связано с частичным протеолизом белка, сопровождающим гибель лимфоцитов при длительном культивировании *in vitro*. Напротив, в тех же условиях количество белка B23-нуклеофозмина прогрессивно увеличивается. Существенно, что количество B23-нуклеофозмина не уменьшается даже через 72 ч после активации лимфоцитов, т. е. когда пул белка Surf-6 истощается. Однако наиболее интересным представляется тот факт, что Surf-6 оказался единственным из проанализированных белков ядрышка, который ни на иммуноцитохимическом уровне, ни на иммуноблотах не выявлялся в покоящихся лимфоцитах периферической крови и селезенки, но присутствовал в фибробластах, находящихся в G_0 -периоде клеточного цикла. Эти наблюдения говорят о том, что индуцированный (в фибробластах мыши NIH/3T3) и естественный (в лимфоцитах) периоды пролиферативного покоя различаются по качественному и количественному составу белков ядрышка. Кроме того, полученные данные показывают, что белок ядрышка SURF-6 проявляет общие свойства с известным маркером пролиферации клеток — белком PCNA, который также отсутствовал в неактивированных лимфоцитах селезенки мыши и периферической крови человека. Это позволяет рассматривать белок ядрышка Surf-6 в качестве нового маркера покоящихся лимфоцитов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-00401-а).

ПОРИСТЫЕ ПЛАСТИНКИ — ИСТОЧНИК МЕМБРАН И НУКЛЕОПОРИНОВ ДЛЯ РАСТУЩЕЙ ЯДЕРНОЙ ОБОЛОЧКИ. © К. Н. Морозова,¹ Е. В. Киселева.² ¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, ¹ morozko@bionet.nsc.ru, ² elka@bionet.nsc.ru.

Пористые пластинки — это уникальные цитоплазматические органеллы, представляющие собой стопки гладких мембранных цистерн, пронизанных пороподобными комплексами, сходными с ядерными поровыми комплексами. Показано, что пороподобные комплексы содержат многие белки, гомологичные нуклеопоринам

ядерных пор. Отличительной особенностью пористых пластинок является то, что они наблюдаются преимущественно в активно растущих и быстро делящихся клетках, таких как клетки эмбрионов, ооциты и опухолевые клетки, в которых происходит активная реорганизация ядерной оболочки. Поскольку появлением пористых пластинок сопровождается злокачественная трансформация клеток, понимание их возможной роли во внутриклеточных процессах относится к актуальным проблемам современной биологии. Однако точная функция пористых пластинок до сих пор не установлена. Целью настоящей работы являлось выяснение роли пористых пластинок в формировании ядерной оболочки и ядерных поровых комплексов в растущих неделящихся клетках. В качестве объекта исследования использовали ооциты амфибий. Сравнительный анализ морфологии пористых пластинок и ядерной оболочки продемонстрировал сходства и различия структурной организации ядерных пор и пороподобных комплексов. Исследования ооцитов амфибий с использованием просвечивающей и сканирующей электронной микроскопии позволили впервые зарегистрировать слияние пористых пластинок, содержащих цитоплазматические поры, с наружной ядерной мембраной. Это дает возможность предполагать непосредственную причастность этих органелл к образованию новых фрагментов ядерной оболочки. Предложена модель формирования новых участков ядерной оболочки с использованием пористых пластинок.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 04-04-48261-а и 07-04-00416-а).

ОСОБЕННОСТИ ИДЕНТИФИКАЦИИ МЕЛКИХ ХРОМОСОМ РАСТЕНИЙ. © О. В. Муравенко, Т. Е. Саматадзе, Н. Л. Большева, О. Ю. Юркевич, А. В. Зеленин. Институт молекулярной биологии РАН, Москва, chrom@imb.ru.

Идентификация хромосом небольших размеров у растений до настоящего времени представляет собой сложную проблему. Известно, что молекулярно-структурная организация небольших хромосом отличается от крупных хромосом распределением повторяющихся последовательностей и обогащенных генами участков по длине хромосом. Мелкие хромосомы содержат значительно меньше повторяющихся последовательностей ДНК различных классов, которые в основном сосредоточены в прицентромерных областях хромосом, а богатые генами участки распределяются по всей длине хромосомных плеч. Растения с мелкими хромосомами обычно имеют и небольшие размеры геномов. Морфологически эти особенности молекулярно-структурной организации геномов выражаются в бедности рисунка С-бэндинга по длине хромосомы, что в свою очередь ведет к невозможности точной идентификации таких хромосом. В этом случае для распознавания индивидуальных хромосом в геноме используют приемы, позволяющие получить для исследования прометафазные хромосомы, на которых разрешающая способность дифференциального окрашивания повышается. Прямое окрашивание стандартными красителями ацетокармином и ацетоорсеином прометафазных хромосом растений выявляет большое число полос, так называемое OR-окрашивание. С помощью этого

метода проведена полная идентификация прометафазных хромосом Mch-генома ромашки аптечной, AD-генома хлопчатника тонковолокнистого и генома гороха посевного. В результате исследования рисунков OR-окраски хромосом у разных сортов изученных видов растений обнаружена внутривидовая консервативность этого типа бэндинга и построены количественные идиограммы, на которых наиболее полно отражены особенности OR-окрашивания хромосом. Для точной идентификации небольших хромосом также используются подходы, выявляющие структурно-молекулярную неоднородность ДНК или локализующие определенные маркерные последовательности ДНК (рибосомные гены, повторяющиеся последовательности и т. п.) по длине хромосом, причем совмещение нескольких методов позволяет не только идентифицировать хромосомы, но и точно локализовать на них определенные последовательности ДНК и установить наличие и тип хромосомных перестроек. В результате окрашивания флуоресцентным АТ-специфичным красителем DAPI митотических хромосом разной степени конденсации у гороха и разных видов льна с одновременной локализацией рибосомных генов FISH-методом стало возможным идентифицировать все хромосомы, проследить изменения рисунка распределения DAPI-положительных бэндов по мере конденсации хромосом от прометафазы к метафазе, точно картировать рибосомные гены в определенных районах хромосом и локализовать точки разрывов хромосом при транслокациях и инверсиях. Для идентификации и сравнения мелких хромосом в геномах А и А^bD^b хлопчатника нами успешно применен и метод репликативного бэндинга. Был использован вариант метода, выявляющий районы хромосом, реплицирующиеся в самом начале S-периода. Обнаруженное сходство распределения ранореплицирующихся районов по длине хромосом позволило установить их гомеологию в родственных геномах А и А^b хлопчатника и показать, что у растений, так же как и у животных, рисунок репликации хромосом достаточно консервативен. Еще одним свидетельством правильности такого утверждения является аналогичность рисунков репликативного бэндинга хромосом давно дивергировавших геномов А и D хлопчатника. В настоящее время полная идентификация хромосом любого размера становится возможной, если применение комплекса молекулярно-цитогенетических методов совмещается с использованием компьютерных программ обработки изображения и хромосомного анализа.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 05-08-33607, 06-04-81007, 07-04-00268 и 07-04-13553).

УЧАСТИЕ ПРОЯДРЫШЕК В СТАНОВЛЕНИИ УПОРЯДОЧЕННОЙ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ИНТЕРФАЗНЫХ ХРОМОСОМ В МЫШИНЫХ ЗИГОТАХ. © Е. М. Нониашвили,¹ О. В. Зацепина,² А. П. Дыбан.¹ ¹ Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Andrei_dyban@inbox.ru, и ² Институт биоорганической химии РАН, Москва.

Для визуализации преждевременно конденсировавшихся хромосом зародыши мышей инкубировали

45 мин в среде с оокаевой кислотой (5 мкмоль/мл) и 45 мин в чистой среде M16. Препараты готовили по методу Дыбана (Dyban, 1993), окрашивали красителем Гимза-R16 и исследовали и фотографировали цифровой фотокамерой Olympus C-40ZOOM. Полученные изображения свидетельствуют о том, что преждевременно конденсировавшиеся хромосомы вступают в прямой контакт с проядрышками. Разработана техника расправления проядрышек на поверхности капли культуральной среды. Этот прием привел к растяжению проядрышек и четкой визуализации районов физической связи преждевременно конденсировавшихся хромосом и проядрышек.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 04-04-48993-а и 07-04-01216-а).

ЭВОЛЮЦИОННО-КОНСЕРВАТИВНЫЕ ГЕНЫ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ КЛЕТОК МОРСКИХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ. © Н. А. Одинцова,¹ К. В. Яковлев,¹ В. А. Дячук,¹ О. Л. Серов.² ¹ Институт биологии моря ДВО РАН, Владивосток, nelodin@mail.ru, и ² Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск.

Механизм реализации программы стволовых клеток на поддержание тотипотентности и плюрипотентности определяется набором генов, регулирующих процессы дифференциации клеток. Ключевым звеном в цепочке регуляции состояния «стволовости» являются два гена — *Oct-4* и *nanog*. Экспрессия гена, кодирующего транскрипционный фактор *Oct-4*, в эмбриональных стволовых и зародышевых клетках раннего эмбриона млекопитающих была установлена в 1990 г. Несколько позже на ранних стадиях эмбрионального развития у морского ежа *Strongylocentrotus purpuratus* была показана экспрессия гомолога, который получил название *SpOct* (Char et al., 1993). Другой ген — *nanog*, кодирующий транскрипционный фактор и регулирующий плюрипотентность стволовых клеток (2003), — был обнаружен пока только в клетках млекопитающих. Мы провели скрининг последовательностей ДНК, гомологичных таковым этих генов у некоторых морских беспозвоночных. Впервые нами были получены результаты, указывающие на присутствие гомолога гена *nanog* млекопитающих в геноме морских ежей: идентичность по аминокислотным остаткам 44.7 %, а позитивность около 64 %. Однако обнаружено, что эти последовательности имеют более высокое сходство с геном *bsx* (brain-specific homeobox gene) мыши: идентичность 61.7 %, а позитивность 80.8 %. У млекопитающих экспрессия гена *bsx* детектируется во время закладки нервной системы, тогда как у морского ежа данные последовательности обнаружены на стадии мезенхимной бластулы (начало гастрюляции). Кроме того, получены предварительные данные о гомологичных последовательностях *Oct-4* в геноме мидии. Эмбриональное развитие у моллюсков характеризуется очень ранней детерминацией, поэтому присутствие последовательностей, гомологичных одному из основных генов, определяющих плюрипотентные свойства клеток, удалось показать пока только на стадии оплодотворенной яйцеклетки. Наши результаты, полученные на беспозвоночных животных, могут помочь в определении общего механизма плюрипотентности эукариот.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-96039), президиума ДВО РАН (проекты 06-II-CO-06-025 и 06-III-B-06-214) и президиума СО РАН (проект 52.2).

ЭФФЕКТ «НУЛЕВОГО» МАГНИТНОГО ПОЛЯ В КУЛЬТУРЕ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ КЛЕТОК И ОБЕСПЕЧЕНИИ ПРОЦЕССОВ РАННЕГО ЭМБРИОГЕНЕЗА. © М. А. Осипенко, Л. М. Бежевикина, Е. Е. Фесенко. Институт биофизики клетки РАН, Пущино, osipenko@rambler.ru.

Одним из факторов, необходимых для нормального роста и жизнедеятельности организмов, является естественное магнитное поле (МП) Земли. Корреляция между циклами деятельности Солнца, миграционными процессами животных, ростом растений и прочими явлениями в органическом мире позволяет говорить о геомагнитном поле как универсальном синхронизаторе жизненных процессов. Многочисленные литературные данные свидетельствуют о том, что особое значение в регуляции функционирования живых систем имеют вариации естественных МП в диапазоне низких и инфранизких частот. Нашей целью было изучение влияния МП крайне малой интенсивности («нулевое» МП) на эмбриональные клетки и в целом на процесс эмбриогенеза зародышей мыши в системе *in vitro*. Для проведения экспериментов по культивированию клеток и изолированных зародышей был сконструирован специальный малогабаритный СО₂-инкубатор, который для создания условий экранирования от МП помещали в камеру из пермаллоя (остаточная величина МП в камере 200 нТл). Влияние практически полной компенсации постоянной компоненты геомагнитного поля обнаружилось при влиянии на адгезию эмбриональных клеток мыши, а также на ростовые характеристики уже образовавшей монослой культуры. Особенно чувствительны клетки, помещенные в камеру в суспензионном виде. Только 50 % таких клеток имели способность к адгезии, в ходе культивирования этот процент значительно снижался из-за некротической гибели клеток. Таким образом, точкой приложения «нулевого» МП являются в первую очередь мембраны. Более устойчивыми были клетки, помещенные в камеру в виде монослоя, однако со временем морфология клеток и направление их роста менялись, клетки образовывали «завитки» и в целом изменялась морфология монослоя. Результаты по влиянию «нулевого» МП были получены и на более сложной модели — ранних зародышах мыши. Подавляющее большинство таких зародышей теряло способность к нормальным делениям дробления уже на самом начальном этапе культивирования. Через 24 ч инкубирования только 50 % двухклеточных зародышей не имели видимых аномалий морфологии. Не развившиеся *in vitro* зародыши окрашивались витальными красителями — трипановым синим и этидиум бромидом. Следовательно, гибель ранних зародышей в «нулевом» поле происходит в результате нарушения барьерных свойств плазматических мембран (некроз). Следует отметить, что 90 % зародышей в естественных геомагнитных условиях и в созданном нами СО₂-инкубаторе развиваются до стадии компактной морулы и бластоцисты, а при помещении инкубатора в камеру, экранирующую МП Земли, в культуре обнаруживаются дегенеративные и фраг-

ментированные зародыши. Обнаруживаются также зародыши, у которых нарушена правильная ориентация двух бластомеров относительно друг друга, что свидетельствует о влиянии МП на локализацию и распределение митотического веретена деления между дочерними клетками. Таким образом, в результате культивирования ранних зародышей мыши в «нулевом» поле нами было установлено, что естественные геомагнитные поля являются существенным фактором физического влияния на эмбриогенез млекопитающих. Они задают и определяют такие ключевые процессы, как деление клеток и их пространственно-временная организация в зародыше. Отсутствие МП Земли приводит к тому, что в культуре эмбриональных клеток и в эмбриогенезе возникает ряд морфофункциональных изменений, которые со временем приводят к гибели. Это указывает на ключевое значение геомагнитных полей в регуляции раннего эмбриогенеза млекопитающих и открывает новые возможности для использования МП в различных частотно-амплитудных диапазонах с целью влияния и, возможно, коррекции процессов развития *in vitro*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-49521).

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ЯДЕРНЫХ РЕЦЕПТОРОВ И Ah-РЕЦЕПТОРА В МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ ГЕПАТОКАНЦЕРОГЕННЫХ АЗОКРАСИТЕЛЕЙ. © М. Ю. Пахарукова, М. А. Сметанина, И. В. Романова, В. И. Каледин, Т. И. Меркулова. Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск.

В организм позвоночных животных попадает огромное количество чужеродных химических соединений — ксенобиотиков, разнообразных по структуре и биологической активности, — лекарств, промышленных химикатов, факторов загрязнения окружающей среды, ряда метаболитов растений; все они должны быть подвергнуты детоксикации и выведению из организма. Для защиты организма от ксенобиотиков существуют внутриклеточные белки-рецепторы, которые, связываясь с ними, индуцируют систему метаболизма и выведения этих веществ. Такие рецепторы принадлежат к семейству ядерных рецепторов и семейству bHLH-PAS. Однако помимо функции детоксикации эти рецепторы вовлечены в большое количество самых разнообразных процессов в клетке, включая апоптоз, регуляцию клеточного цикла, дифференцировку и т. д. (Carlson, Pedrew, 2002; Handshin, Meyer, 2003). Некоторые из рецепторов ксенобиотиков ответственны за перерождение клетки в раковую и формирование опухолей. В последнее время активно изучаются механизмы вовлеченности ядерных рецепторов и их сигнальных путей в развитие опухолей под действием связываемых ими ксенобиотиков. В нашей работе мы изучали эту проблему на модели чувствительности и устойчивости животных к канцерогенному действию аминазокрасителей. Известно, что у ряда линий мышей (SWR, A/He, DD, DBA/2 и CBA) опухоли печени развиваются под действием ортоаминоазотолуола (OAT), а крысы и мыши других линий (AKR и CC57Br) не чувствительны к гепатоканцерогенному действию этого соединения (Каледин, Захарова, 1984). В отличие от этого крысы чувствительны к гепатоканцерогенному дейст-

вию 3'-метил-N,N-диметил-4-аминоазобензола (3'-МеДАБ), а мыши, морские свинки, бурундуки и др. к нему резистентны. Механизмы, обеспечивающие такую избирательность формирования опухолей печени, в настоящее время не выяснены. Задачей работы являлось изучение влияния азокрасителей на активность ядерных рецепторов (PPAR, CAR, PXR и LXR) и представителя bHLH-PAS-семейства — арилгидрокарбонового рецептора (AhR) в печени мышей и крыс. Методом задержки в геле показано, что из всех исследованных нами рецепторов ксенобиотиков только AhR и конститутивный рецептор андростанов (CAR) активировались видоспецифическим образом в печени мышей и крыс в ответ на гепатоканцерогенный для данного вида аминокраситель. Так, в печени мышей в ответ на гепатоканцерогенный для них ОАТ ДНК-связывающая активность AhR и CAR увеличивается в 6.3 и 2.9 раза соответственно, тогда как в ответ на неканцерогенный для этих животных 3'-МеДАБ — лишь в 2.0 и 1.8 раза. В печени крыс, наоборот, AhR и CAR активируются сильнее под действием крысинного гепатоканцерогенеза 3'-МеДАБ (в 5.3 и 2.4 раза соответственно), чем гепатоканцерогенного для мышей ОАТ (в 2.5 и 1.5 раза). Результаты Вестерн-блот-анализа показали, что возрастание активности CAR и AhR связано не с увеличением их содержания, а, по-видимому, с изменением состояния этих белков (например, в результате связывания азокрасителей). Для AhR человека показано, что азокрасители могут являться его лигандами (Kato et al., 2002), однако эффект различной активации AhR под действием канцерогенных и неканцерогенных азокрасителей до сих пор не был показан. Для выяснения того, может ли CAR также связывать азокрасители, мы провели исследования конкуренции ОАТ и 3'-МеДАБ с известным лигандом CAR — ³H-5 α -андрост-16-ен-3 α -олом — за связывание с белками цитозоля клеток печени. Оказалось, что ОАТ является лучшим конкурентом, чем 3'-МеДАБ, при использовании цитозоля из печени мышей, а 3'-МеДАБ конкурирует лучше, чем ОАТ, при использовании цитозоля из печени крыс, т. е. CAR, по-видимому, по-разному связывает канцерогенные и неканцерогенные азокрасители. В качестве негативного контроля использовали прогестерон и клофибрат. Полученные результаты показывают, что CAR и AhR, по-видимому, вовлечены в распознавание аминокрасителей и опосредование их опухолераспространяющих эффектов у чувствительных к ним животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-48575).

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗМЕНЕНИЙ УРОВНЯ И РИСУНКА ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ β -КАТЕНИНА, БЕЛКА p130 И ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА E2F4 В МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ПРИ ИХ СОКУЛЬТИВИРОВАНИИ С КЛЕТКАМИ ЛИНИИ A-549. © Н. С. Петров,¹ Т. В. Злобина,¹ В. Б. Сериков,^{2,4} А. М. Зайчик,⁴ Б. К. Комяков,³ Б. Г. Гулиев,³ М. Ю. Алексеев,³ Б. В. Попов.^{1,2} ¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ² Исследовательский институт Детского госпиталя г. Оакленд, Калифорния, США, ³ С.-Петербургская государственная медицинская академия им. И. И. Мечникова и ⁴ С.-Петербургская государственная академия последипломного образования МЗ РФ.

Ранее мы разработали модель для изучения *in vitro* энтодермальной дифференцировки мезенхимных стволовых клеток (МСК) при их сокультивировании с легочными эпителиальными клетками линии A-549 в условиях разделения клеточно-непроницаемой мембраной. В таких условиях в МСК происходят увеличение общего количества β -катенина и его активация, а также индукция экспрессии легочных эпителиальных маркеров. В настоящей работе установлено, что повышение уровня и активности β -катенина в МСК при их сокультивировании с клетками линии A-549 сочетается с увеличением общего количества и с накоплением активных форм белка p130 (члена семейства продукта гена ретинобластомы) и транскрипционного фактора E2F4. Найденные изменения уровня и активности β -катенина, p130 и E2F4 в МСК подобны тем, которые возникают в этих клетках при действии ионов лития. Известно, что ионы лития ингибируют активность киназы GSK3 β и, таким образом, вызывают активацию сигнального пути Wnt/ β -катенин. Повышение общего уровня β -катенина и белка p130 в МСК при их сокультивировании с клетками линии A-549 или обработке ионами лития, возможно, имеет общий механизм, включающий в себя ингибирование синтеза киназой GSK3 β их специфических гиперфосфорилированных форм, образование которых активирует убиквитинацию этих белков с последующей их деградацией в протеасомах. Ингибирование образования специфических форм гиперфосфорилированных белков блокирует их деградацию и способствует увеличению общего уровня β -катенина и p130. В целом полученные результаты позволяют предполагать, что активация сигнального пути Wnt/ β -катенин в МСК под влиянием факторов, выделяемых клетками A-549, сочетается с образованием активного комплекса p130—E2F4, который, вероятно, играет ключевую роль в сочетанной активации их дифференцировки и индукции ареста клеточного цикла.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-48439а) и президиума С.-Петербургского научного центра РАН.

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ В УСЛОВИЯХ ПРОЛОНГИРОВАННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ С РЕКОМБИНАНТНЫМ БЕЛКОМ LIF. © Р. Р. Петрова, Л. М. Межевикина, Е. Е. Фесенко. Институт биофизики клетки РАН, Пущино, rushap@rambler.ru.

Повышенное внимание к эмбриональным стволовым клеткам (ЭСК) млекопитающих вызвано тем, что культивируемые ЭСК являются источником дифференцированных клеток для исследовательских целей и практической медицины. Дифференцировку ЭСК индуцируют в основном через стадию образования эмбрионидных тел (ЭТ) с помощью химических факторов и разных приемов культивирования на фидерных слоях. При этом в культуре формируется гетерогенная клеточная популяция, доля в которой клеток определенного фенотипа небольшая, что является существенным ограничением для практического использования ЭСК. В наших исследованиях показано, что дифференцировку ЭСК мыши линии R1 в клетки с сократительной активностью по типу кардиомиоцитов можно вызывать, минуя стадию образования

гетерогенных ЭТ. Для этого использовали технику пролонгированного культивирования клеток R1 в виде колоний с функционально активным рекомбинантным секреторным белком LIF, полученным в результате трансфекции эукариотических клеток линии Cos-1 рекомбинантной конструкцией pCDNA3-*lif*. В качестве контроля использовали коммерческий препарат рекомбинантного белка LIF прокариотического происхождения (ICN). При таких условиях культивирования в присутствии рекомбинантного LIF из трансфицированных Cos-1 клеток (LIF-Cos) на 20—26-е сут в плюрипотентных колониях ЭСК R1, размеры которых к этому времени достигают порядка $1.55 \pm 0.40 \text{ мм}^2$ ($1.6 \cdot 10^4 \pm 29 \cdot 10^4$ клеток, $n = 6$), появляются отдельные очаги с автономной сократительной активностью. Хотя видимых признаков морфологической дифференцировки не выявляется, при цитохимическом определении активности эндогенной щелочной фосфатазы (ЭЩФ) обнаруживается неравномерное окрашивание по всей площади колонии. Процессы, связанные с эмбриональной дифференцировкой R1, проходят на границе раздела более плотной центральной массы плюрипотентных клеток с высокой активностью ЭЩФ и периферического монослоя. В одной и той же колонии регистрируется несколько очагов сократительной активности, различающихся между собой по размерам, амплитуде и частоте сокращений. Принадлежность дифференцированных R1 с сократительной активностью к кардиомиоцитарному типу клеток подтверждена с помощью моноклональных антител к α -актину мыши (Chemicon). Более ранние предшественники кардиомиоцитов имеют в культуре *in vitro* небольшие размеры и округлую форму. В процессе последующей дифференцировки формируются более вытянутые клетки с саркомерной организацией. Поскольку ЭСК R1 на 20—26-е сут культивирования в виде колоний обнаруживают миофиламентный α -актин, их можно с уверенностью отнести к первично-дифференцированным эмбриональным кардиомиоцитам. Таким образом, наши результаты свидетельствуют о том, что при использовании техники пролонгированного культивирования ЭСК мыши с рекомбинантным белком LIF-Cos активируются процессы как пролиферации (рост ЭСК в виде колоний), так и кардиомиоцитарной дифференцировки (появление в колониях очагов сократительной активности). При этом коммерческий препарат LIF (ICN) не влияет на дифференцировку ЭСК в кардиомиоциты, что соответствует современным представлениям о снижении активности генов, кодирующих эукариотические белки, в прокариотических системах экспрессии из-за отсутствия необходимых для нормального функционирования посттрансляционных модификаций полипептидных цепей. Высокая активность рекомбинантного LIF-Cos находит подтверждение в работах по LIF-регуляции ЭСК млекопитающих, согласно которым LIF активирует разные пути цитоплазматической сигнализации и влияет на процессы дифференцировки плюрипотентных клеток. Переключение регуляции, как показали исследования, возможно при изменении длительности культивирования ЭСК мыши с LIF-Cos. При непродолжительном культивировании в течение 3 сут этот белок активирует преимущественно пролиферацию клеток. Когда численность клеток в колонии достигает порядка $1.6 \cdot 10^4$ клеток, меняется характер межклеточных взаимодействий и происходит переключение LIF-регуляции в направлении кардиомиоцитарной дифференцировки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-49521).

ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИИ НЕЙТРОФИЛОВ, ИССЛЕДОВАННЫХ МЕТОДОМ СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ. © С. Н. Плескова, Ю. Ю. Гущина. НОЦ «Физика твердотельных наноструктур» Нижегородского государственного университета.

Хемотаксис нейтрофилов, процессы адгезии и фагоцитоза зависят от многих факторов внутренней среды организма. Целью работы было исследование морфологии нативных нейтрофильных гранулоцитов методом сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ) в средах с разными значениями pH. Нейтрофилы получали из крови здоровых доноров на двойном градиенте фиколла—верографина. После двухкратной отмывки их переносили в пластиковые чашки Петри (Corning, США), инкубировали в течение 20 мин, добиваясь спонтанной адгезии, и исследовали методом СЗМ на Solver Bio (NT MDT^{co}, Зеленоград). В физиологическом растворе (NaCl, pH 7.1—7.2) размеры клеток (высота и диаметр) не изменялись в течение 2 ч наблюдения. В растворе Хенкса (в котором значение pH значительно изменялось от 7.2 в начале эксперимента до 8.2 в конце — через 3 ч) размеры клеток существенно увеличивались, после 40-й мин их диаметр превышал первоначальный более чем в 2 раза. Однако клетки не теряли адгезии, и процесс сканирования можно было продолжать в течение 4 ч. В фосфатно-солевом буфере значение pH поддерживалось постоянным на всем протяжении эксперимента (7.3—7.4 в течение 4 ч). Тем не менее сканирование в фосфатно-солевом буфере приводило к существенному увеличению параметров клеток на 35—60-й мин эксперимента. Кроме того, отмечались атипичная морфология клеток и их высокая вязкость (поверхность клеток «размазывалась» сканирующим зондом). Увеличение параметров клеток в процессе сканирования свидетельствует о том, что не только изменение pH является неблагоприятным фактором в процессе длительного наблюдения за клетками. При использовании буферных растворов с нефизиологичными значениями pH (цитратно-фосфатный — pH 5.0, карбонатно-бикарбонатный — pH 9.6) не происходило адгезии нейтрофилов к поверхности чашки Петри, поэтому проведение сканирования было невозможно. Таким образом, было установлено, что исследования в физиологическом растворе могут осуществляться длительное время без изменения клеточной морфологии. Было проведено исследование в 0.9%-ном растворе NaCl морфологических характеристик клеток после внесения в среду H₂O₂ в концентрации от 0.01 до 0.10 %. Известно, что H₂O₂ является одним из продуктов окислительного взрыва в процессе фагоцитоза, однако внесенная эндогенно H₂O₂ может выступать в качестве апоптогенного или некротического фактора в зависимости от концентрации. Наблюдение за клетками методом АСМ после внесения H₂O₂ в концентрации от 0.01 до 0.10 % вызвало значительное изменение морфологии клеток. Эти изменения были неоднородны. У части доноров на 15—25-й мин наблюдения мембрана клеток становилась уплощенной и плотно прилегала к поверхности подложки, клетка теряла значительную часть объема, визуализировалось большое количество мелких гранул, нехарак-

терных для нативного нейтрофила, клетка становилась крайне чувствительной к сканированию — зонд «отдирал» клетку на 60-й мин сканирования. В других случаях клетка не изменяла объема даже через 60—70 мин после внесения H_2O_2 , но клетки полностью утрачивали структуру, характерную для нативного нейтрофильного гранулоцита (выступающее ядро, окруженное мембраной), становились неровными, бугристыми и «не чувствительными» к сканированию. Наблюдение в течение 200 мин не вызывало отрыва клетки от поверхности подложки.

АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЯ ОБЪЕМА БЛАСТОМЕРА МЫШИ В РЕЗУЛЬТАТЕ ОСМОТИЧЕСКОГО ШОКА: 3-D-РЕКОНСТРУКЦИЯ И ЛАЗЕРНАЯ СКАНИРУЮЩАЯ МИКРОСКОПИЯ. © А. Г. Погорелов,^{1,2} А. М. Аксиров,¹ В. А. Голиченков,³ М. А. Погорелова,³ В. А. Яшин.⁴
¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, agorogelov@gambler.ru, ² Факультет биофизики и биомедицины Пушкинского государственного университета, ³ Биологический факультет Московского государственного университета и ⁴ Институт биофизики клетки РАН, Пушкино.

Изменение объема клетки и механизмы, индуцированные этим фактором, играют важную роль в регуляции ряда функций: эпителиального транспорта, метаболизма, возбуждения, выброса гормонов, миграции клетки, пролиферации и смерти клеток. Уже в феноменологической теории деления и канцерогенеза (Cope, 1971) сфероидная форма клетки рассматривается как один из необходимых признаков митоза. Таким образом, объем является не только интегральной характеристикой, описывающей состояние клетки, но и частью ее физиологии. Мембрана клетки чрезвычайно проницаема для воды. Величина и вектор водного потока обусловлены градиентом осмотически активных компонент на мембране и активностью аквапориновых каналов. Указанные факторы являются причиной изменения клеточного объема. Считается, что в ткани межклеточная среда сохраняет постоянные характеристики, точные значения которых тем не менее остаются неизвестными. Поэтому для экспериментальных систем, которые развиваются *in vitro*, например изолированный ранний эмбрион млекопитающих, поддержание интактного объема клетки является необходимым, но трудновыполнимым условием. Прежде всего это обусловлено отсутствием аналитических подходов при изучении влияния внеклеточной среды на объем отдельного blastomera. В данной работе пространственные характеристики эмбриона определяли после его 3-D-реконструкции в среде 3ds max5. Серию последовательных изображений получали в результате томографии объекта методом лазерной сканирующей микроскопии (Zeiss, LSM 510). Дополнительное контрастирование изображения проводили посредством компьютерной программы Photoshop 6.0. Для сохранения интактной формы (объема) эмбриона использовали быструю криофиксацию с последующей низкотемпературной дегидратацией в вакууме. Затем препарат заключали в заливочную среду. В эксперименте эмбрион в течение 15 мин подвергали действию осмотического шока в гипо-, изо- и гипертоническом растворе Дюльбекко. В качестве контроля рассматривали ситуацию сразу после выделения эмбриона из яйцевода. При 15-минутном осмотическом шоке двухклеточных эмбрионов мыши, индуциро-

ванном добавлением к среде Дюльбекко NaCl, для концентраций NaCl в среде 0 (контроль), 70, 140 и 280 мМ получены величины объема blastomera соответственно 58 ± 3 , 85 ± 5 , 53 ± 3 и 29 ± 2 тыс. μm^3 (для 14, 10, 16 и 16 blastomeres соответственно; указаны средние значения объема и среднеквадратичные отклонения). Анализ полученных результатов показывает, что уже через 15 мин воздействия наблюдается изменение объема эмбриональной клетки в соответствии с направленностью осмотического шока. Отсутствие линейной зависимости можно объяснить вкладом аномального осмоса и(или) электроосмоса. В классической электрохимии указанные факторы реализуются для ионов при наличии потенциала на мембране. Именно такие условия характерны для клетки, если рассматривать движение воды в комплексе с системой активного и пассивного транспорта ионов. По-видимому, не следует исключать вклад оболочки эмбриона при компенсации гидростатического давления в гипотоническом растворе. Следует отметить, что изотонический раствор Дюльбекко вызывает набухание blastomera.

ОРГАНИЗАЦИЯ ДНК ЦЕНТРОМЕРА МЫШИ.
 © О. И. Подгорная, А. С. Комиссаров, А. В. Федоров. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

У млекопитающих ДНК центромер (Цен) относится к группе сателлитных ДНК (сатДНК) — tandemно организованных высокоповторяющихся последовательностей. Цен и перичентромерные районы остаются «белыми пятнами» на картах хромосом, появившихся в результате чтения геномов человека и мыши (Waterstone et al., 2004). Отсутствие ДНК-карты высокого разрешения района Цен привело к отсутствию общепринятой модели его организации. Попытки конструирования искусственной хромосомы основаны на предположении о том, что только один тип сатДНК входит в состав Цен (α -сатДНК человека или минорный — МиСат — мыши). Однако относительно стабильно наследующиеся конструкции всегда содержат неизвестный материал материнского генома. Мы клонировали и сиквенировали последовательность мышиного сателлита 3 (MS3) из фракции хромоцентров мыши. Компьютерный анализ MS3 методом множественного выравнивания, определения кривизны фрагмента, поиска матриксассоциированных районов (MAR) по сравнению с известными сатДНК мыши показал, что MS3 нет в базах данных. 2.2 % тотальной ДНК составляет MS3 с длиной мономера 160 п. н. «Лесенка», характерная для сатДНК, выявляется на Саузерн-блоте с рестрицированной тотальной ДНК и меченым MS3. Гибридизация на растянутом хроматине (fiberFISH) показала, что блоки МиСат и MS3 длиной около 2 т. п. н. перемежаются в районе Цен. Однако на тянутых фибриллах района Цен интерфазного хроматина остались места, не покрытые ни одним из клонированных фрагментов сатДНК. Предполагается клонировать недостающий кусок нормального Цен после ПЦР ДНК хромоцентров на праймерах, специфичных для МиСат и MS3. Ранее предложенная модель Цен предполагает наличие не менее 3 типов сатДНК, различающихся по содержанию GC и третичной структуре ДНК. В соответствии с моделью минимальный Цен должен содержать повторяющуюся единицу размером около 6 т. п. н. из 3 типов сатДНК. СатДНК слабо представлены в базах геномов. Однако

МиСат со сходным содержанием в геноме (около 1 %) захватывался при клонировании. Так как консенсуса MS3 не нашли тривиальными методами выравнивания, проанализировали базу контигов, которые не положены на хромосомы (non placed sequences, или chromosome unknown). СатДНК определили как разновидность tandemных повторов с заданным размером единицы, возможные мини- и микросателлиты изъяты из рассмотрения. При строгих параметрах поиска программой Tandem Repeat Finder обнаружено несколько тысяч консенсусов, которые при распределении по содержанию GC обнаруживают пики в 38 % GC (пик 1) и 51 % GC (пик 2). Консенсус МиСат принадлежит пику 1, консенсус MS3 — пику 2. Созданная база консенсусов tandemных повторов обладает предсказательной силой и может быть использована для поиска неизвестных и(или) недостающих для полного Цен сатДНК. Тенденции распределения tandemных повторов по содержанию GC сходны у разных видов млекопитающих (мыши, крысы, собаки и человека), несмотря на то что сатДНК как разновидность tandemных повторов отличается видоспецифичностью. Дальнейший анализ баз tandemных повторов, возможно, поможет понять, каким образом высококонсервативные Цен-белки избирательно связываются с Цен сатДНК, которые у разных видов не имеют ничего общего по первичной последовательности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-49156-а).

ОЦЕНКА МУЛЬТИПОТЕНТНОСТИ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ В КОЛОНИЯХ. © Е. И. Полякова,¹ Ю. В. Маленьких,¹ Н. С. Николаенко,² Г. П. Пинаев.² ¹ С.-Петербургский политехнический университет и ² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Согласно литературным данным, культивируемые стромальные клетки костного мозга (СККМ) различных видов животных (грызунов и человека) мультипотентны и под действием специфических индукторов способны дифференцироваться в различных гистогенетических направлениях. Общепринятым подходом является длительное культивирование клеток при высокой плотности в средах с индуктором дифференцировки и с высоким содержанием сыворотки. Такое культивирование помимо направленной дифференцировки обычно приводит к неконтролируемой спонтанной дифференцировке СККМ. Чтобы устранить этот недостаток, мы культивировали СККМ крысы при низкой плотности посева (50—100 кл./см²) в среде с высоким (10 %) содержанием сыворотки, когда они растут в колониях. Оказалось, что при этом клетки способны к дифференцировкам под действием специфических индукторов. Задачей данной работы являлось сравнительное исследование дифференцировки в ортодоксальных направлениях СККМ крысы, растущих в колониях. С помощью специфических гистохимических окрасок было показано, что около 50 % колоний способны к дифференцировке в хондрогенном направлении, в адипоцитарном направлении дифференцируется 20—30 % колоний, в остеогенном — менее 20 % колоний. При такой дифференцировочной потенции можно предположить, что в разных направлениях могут

дифференцироваться разные колонии. Следовательно, в исследуемой популяции СККМ крысы присутствует менее 20 % мультипотентных стволовых клеток. Однако согласно оценке методом лимитирующего разведения колоний высокоочищенных адгезивных клеток костного мозга в среде с 2 % сыворотки, количество мультипотентных стволовых клеток составляет только 0.1 %. В нашем случае еще предстоит провести такое исследование, затрудненное низкой жизнеспособностью СККМ крысы при клонировании методом лимитирующего разведения в среде с 2 % сыворотки.

ДЕГЕНЕРАЦИЯ СЕТЧАТКИ У МУТАНТА *trp* ДРОЗОФИЛЫ ПРЕДОТВРАЩАЕТСЯ НОКАУТОМ ГЕНА *norpA* ФОСФОЛИПАЗЫ С: РОЛЬ PIP₂ КАК ИНГИБИТОРА АПОПТОЗА. © А. Д. Поляновский,¹ Т. М. Алексеева,¹ Т. Р. Барбер,² Р. К. Харди.² ¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии РАН, Санкт-Петербург, arplyan@mail.ru, и ² Кембриджский университет, Великобритания.

Ген *trp* у дрозофилы кодирует светочувствительный Ca²⁺-канал TRP, ответственный за световую деполяризацию фоторецепторных клеток. TRP является прототипом всевозрастающего семейства канальных белков, осуществляющих сигнальную трансдукцию во многих клетках. Мутация гена *trp* вызывает светозависимую дегенерацию сетчатки, механизм которой до сих пор остается неясным. Электронно-микроскопическое исследование показало, что эта дегенерация у мутанта *trp* (при непрерывном дневном освещении в течение 2 нед) предотвращается нокаутом гена *norpA* фосфолипазы С (PLC), но не предотвращается экспозицией при красном свете и генетической элиминацией мест фосфорилирования родопсина. На основании этого предполагаются: 1) основной причиной дегенерации сетчатки у мутанта *trp* является стимулирующее апоптоз патологическое истощение PIP₂, вызванное отсутствием входа Ca²⁺ в фоторецепторную клетку через TRP-каналы; 2) гиперфосфорилирование родопсина и образование комплекса метародопсин—аррестин если и вносят свой вклад в дегенерацию, то крайне незначительный. Также показано, что дегенерацию сетчатки самого мутанта *norpA* можно полностью предотвратить экспозицией при красном свете, но лишь частично — элиминацией мест фосфорилирования родопсина (мутация Δ356). Учитывая самое широкое распространение TRP-каналов у млекопитающих, в частности в сердечной мышце, и их важную роль в регуляции входа Ca²⁺ при фосфоинозитидной сигнальной трансдукции, фоторецепторы дрозофилы могут быть удобной моделью для изучения роли PIP₂ как ингибитора апоптоза, а его истощения в PLC-каскадах — как причины некоторых патологий.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-01127) и С.-Петербургского научного центра РАН.

ХРОМОМЕРНЫЙ УРОВЕНЬ ОРГАНИЗАЦИИ ХРОМАТИНА В МАКРОНУКЛЕУСЕ ИНФУЗОРИИ. © В. И. Попенко,¹ Б. П. Караджан,² О. Г. Леонова,¹ Ю. Л. Иванова.¹ ¹ Институт молекулярной биологии РАН, Москва, и ² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Электронно-микроскопические и цитологические данные показывают, что один из уровней компактизации ДНК в метафазных хромосомах высших эукариот представлен хромомерами — дискретными хроматиновыми структурами, формирующими толстые фибриллы (хромонемы) в хромосомах. В полиплоидных соматических ядрах многих инфузорий неактивный хроматин организован в электронно-плотные хроматиновые тельца размером 60—200 нм. В данной работе мы исследовали организацию хроматина в макронуклеусах инфузорий с субхромосомным размером молекул ДНК — *Bursaria truncatella*, *Didinium nasutum* и *Paramecium caudatum*. Полученные данные показывают, что такие хроматиновые тельца обладают всеми чертами хромомеров высших эукариот: они сходны по размерам, декомпактизуются в гипотонических растворах с образованием ореола из петель фибрилл хроматина вокруг них, в условиях *in vivo* и *in vitro* способны формировать хромонемоподобные фибриллы толщиной 100—300 нм. На препаратах выделенного хроматина, распластанного на поверхности гипофазы с низкой ионной силой, визуализированы организующие центры хроматиновых телец. Полученные данные показывают, что хромомеры обнаруживаются не только в ядрах высших эукариот, где молекулы ДНК имеют большой размер, но и в ядрах с молекулами ДНК малого размера. Это подтверждает идею о том, что хромомеры представляют собой универсальный уровень организации хроматина в клетках эукариот.

РЕГУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ, ОПОСРЕДОВАННАЯ БЕЛКОМ РЕТИНОБЛАСТОМЫ pRb И ТРАНСКРИПЦИОННЫМ ФАКТОРОМ E2F4: РОЛЬ КОНФОРМАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ pRb. © Б. В. Попов,^{1,2,4} А. М. Зайчик,³ Н. С. Петров,¹ Т. В. Злобина,¹ Л.-С. Чанг.⁴ ¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ² Детский госпиталь, Торонто, Канада, ³ С.-Петербургская государственная академия последиplomного образования МЗ РФ и ⁴ Детский госпиталь Университета штата Огайо, Колумбус, США.

Координация пролиферации и дифференцировки в клетках, коммитированных к мышечной специализации, осуществляется путем взаимодействия белка ретинобластомы (pRb) с транскрипционными факторами семейств E2F и MyoD. Аффинитет взаимодействия pRb с различными членами семейства E2F существенно различается, однако механизмы этого взаимодействия не полностью изучены. Мы обнаружили, что pRb, неспособный взаимодействовать с Т-антигеном в результате делеции 6 аминокислот в сайте связывания этого белка ($\Delta S/N$), сохраняет способность ингибировать рост опухолевых клеток и вызывать арест клеточного цикла при временной или стабильной экспрессии в клетках с различным фенотипом за счет увеличения продолжительности фаз G₀/G₁ и G₂/M. $\Delta S/N$ показывает повышенный аффинитет к E2F4, связывает гиперфосфорилированные формы E2F4 и вызывает стабильное увеличение уровня E2F4 в покоящихся клетках с конституционной экспрессией $\Delta S/N$. Способность $\Delta S/N$ формировать комплексы с E2F4 на ДНК сочетается с увеличением уровня «свободного» E2F, связанного с ДНК, но не образующего комплексов с белками семейства pRb. $\Delta S/N$ также способен ингибировать экспрессию репортерной конструкции, содержащей

сайты связывания E2F, путем преимущественного связывания E2F4, но не E2F1. Стабильная экспрессия $\Delta S/N$ в полипотентных фибробластах способствует активации как начальной, так и терминальной стадий их дифференцировки в мышечные клетки, однако последняя может быть предотвращена путем экспрессии экзогенного E2F4. Полученные результаты позволяют предполагать, что pRb существует в различных конформационных состояниях, опосредующих альтернативное взаимодействие этого белка с различными молекулами E2F, в частности с E2F1 и E2F4, что обеспечивает надежность регуляции клеточного цикла и дифференцировки, опосредованной pRb.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-48439-а) и президиума С.-Петербургского научно-го центра РАН.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕТЕРОХРОМАТИНОВЫХ БЕЛКОВ HP1 И SUUR В КЛЕТКАХ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ У *Drosophila melanogaster*. © Г. В. Похолкова, Л. В. Болдырева, Е. С. Беляева, Т. Д. Колесникова, Е. Н. Андреева, С. А. Демаков, А. В. Пиндюрин. Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, galina@bionet.nsc.ru.

У дрозофилы выделяют два главных типа эпигенетической репрессии генов (сайленсинга). В формировании первого ведущая роль отводится гетерохроматиновым белкам HP1 и метилтрансферазе SU(VAR)3-9, а второго — белкам Pc-G. Первый собирается в прицентромерном гетерохроматине (ПГХ) и вызывает также мозаичную инактивацию приближенных к нему эухроматиновых генов. Второй обеспечивает сайленсинг генов в эухроматиновой части генома. На цитологическом уровне сайленсинг проявляется в формировании хроматиновых блоков ПГХ и плотных дисков интеркалярного гетерохроматина (ИГХ), рассеянных в эухроматиновых плечах хромосом. Известно, что районы ИГХ содержат кластеры уникальных генов, которые координированно экспрессируются, поздно реплицируются и часто недореплицируются в политенных хромосомах. Мутация *Su-UR* (suppressor of underreplication) супрессирует недорепликацию (в ИГХ полностью, в ПГХ — частично), добавочные дозы *SuUR*⁺, напротив, усиливают ее. Белок SUUR, как и белок HP1, обнаруживается на политенных хромосомах в районах ПГХ, а также в районах ИГХ, многие из которых содержат белки Pc-G. Возможно ли взаимодействие белков SUUR, HP1 и Pc-G? Мы показали взаимозависимость локализации белков HP1 и SUUR на политенных хромосомах: SUUR не выявлялся у гетерозигот с 0-мутациями HP1 и гомозигот с аллелем *HisH2Av*⁸¹⁰, характеризующихся отсутствием HP1, связанного с хроматином. Искусственное привлечение белка HP1 в районы, где в норме отсутствовали HP1 и SUUR, сопровождалось появлением в них четко локализованных сигналов SUUR и HP1. Наблюдали корреляцию между степенью оверэкспрессии, числом сайтов SUUR и способностью этих сайтов связывать HP1, при этом количество HP1 в клетках не возрастало. Этот эффект SUUR специфичен: перераспределение HP1 происходит только при оверэкспрессии N-концевых фрагментов SUUR, но не C-концевых. У мутантов *Su(var)3-9^{pm}* с гиперфункцией метилтрансферазы перераспределение

HP1 направлено в места обычной локализации SUUR, т. е. в районы ИГХ. Таким образом, районы ИГХ являются частыми сайтами локализации белка HP1 при его перераспределении в эухроматиновые сайты благодаря присутствию в них SUUR. Напротив, белки SUUR и Pc-G, по-видимому, связываются с хроматином независимо. Результаты дрожжевого двухгибридного теста позволяют предполагать взаимодействие белка SUUR с «теневым» хромодоменом белка HP1. В целом наши данные указывают на возможность функционирования SUUR в комплексе с HP1.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проекты 06-04-49305-а и 06-04-48387-а), Междисциплинарным интеграционным проектом РАН (грант № 45), по программе РАН «Молекулярная и клеточная биология» (грант № 10.1), по программе РАН «Ведущие научные школы» (грант № 942.2006.4) и в виде гранта президента РФ МК-540.2007.4.

АНАЛИЗ СООТНОШЕНИЯ ГОМЕОЛОГИЧНЫХ ХРОМОСОМ В КЛОНАХ МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДНЫХ КЛЕТОК. © И. Е. Пристяжнюк, О. И. Солдаткина, С. А. Телмирова, Н. М. Матвеева, Н. А. Сердюкова, А. С. Графодатский, О. Л. Серов. Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, iprist@mail.ru.

Возможность репрограммирования генома дифференцированных клеток при помощи их слияния с плюрипотентными эмбриональными стволовыми (ЭС) клетками в последнее время привлекает внимание многих исследователей (Ambrosi, Rasmussen, 2005). В нашей лаборатории было получено 20 клонов гибридных клеток НМС-серии посредством слияния ЭС-клеток *Mus musculus* (Mm) и спленоцитов *Mus caroli* (Mc). Согласно микросателлитному и цитогенетическому анализу, хромосомный состав НМС-клонов варьировал от околодиплоидного до околотетраплоидного, демонстрируя предпочтительную потерю хромосом дифференцированного партнера (Matveeva et al., 2005). В некоторых клонах остались лишь единичные хромосомы соматического партнера (Пристяжнюк и др., 2005). Таким образом, для изучения процессов репрограммирования в клетках гибридных клонов необходимо знать реальное соотношение в них родительских хромосом. Для идентификации родительских хромосом мы использовали двухцветную флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) с зондами к перичентромерным районам хромосом Mm и с зондами, специфичными для индивидуальных хромосом мыши 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 16, 17, 18, 19 и X. Этот метод позволил нам с надежностью определить принадлежность гомеологов любой из данных хромосом к тому или другому из партнеров по слиянию. Было показано следующее. 1. 5 из 20 НМС-клонов имеют околотетраплоидный набор хромосом плюрипотентного партнера, а хромосомы Mc при этом сохраняются лишь в единичных клетках этих клонов. 2. В 3 из 20 клонов соотношение гомеологов Mm и Mc было 3 : 1 для большинства исследованных хромосом. Предполагается, что, как и вышеупомянутые клоны, эти гибриды были изначально гексаплоидами, однако сегрегация хромосом, происходящих от спленоцитов, в них не настолько выражена. 3. Большая часть исследованных клонов имела соотношения ро-

дительских хромосом Mm и Mc 2 : 1 (в 5 из 20 клонов) и 2 : 2 (в 3 из 20 клонов). 4. В ряде клонов соотношение гомеологов некоторых хромосом было обратным (1Mm:2Mc), что свидетельствует о двухсторонней сегрегации родительских хромосом. Следует отметить, что выделение гибридных клонов серии НМС производилось в селективных условиях, на среде НАТ, что способствовало сохранению в клонах X-хромосомы *Mus caroli*, несущей селективируемый ген *Hprt*. По содержанию X-хромосомы все гибридные клоны могут быть разделены на 2 класса: с соотношениями Mm и Mc 2 : 1 и 1 : 1. Во всех клонах гибридных клеток наблюдалась тенденция к увеличению количества копий хромосом 1 и 11, причем независимо от их родительского происхождения. Известно, что ряд генов, ответственных за поддержание недифференцированного состояния (*Oct-4*, *Nanog* и *Stat3*), локализованы в хромосомах 17, 6 и 11 соответственно. Анализ соотношения этих хромосом не выявил какой-либо корреляции в их содержании и характеристиках плюрипотентности исследованных клонов. Таким образом, наши результаты показывают, что в клонах серии НМС имеет место широкая вариабельность в соотношении индивидуальных хромосом, происходящих от разных партнеров по слиянию. Это обстоятельство необходимо принимать во внимание при исследовании клонов эмбриональных гибридных клеток на сохранение плюрипотентности и репрограммирование родительского генома.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 02-04-49319 и 07-04-00528), по Интеграционным проектам СО РАН (гранты 14.2 и 5.2) и в виде гранта Welcome Trust 064782/Z/01/Z.

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЙ ПРЕПАРАТ РИФАМПИЦИН БЛОКИРУЕТ КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ И ИНДУЦИРУЕТ АПОПТОЗ В ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ. © А. В. Прокопенко,¹ М. В. Ерохина,^{1,2} Е. А. Александрова,² Г. Е. Онищенко.¹ ¹Московский государственный университет и ²Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза РАМН, Москва.

Рифампицин — полусинтетический антибиотик, применяющийся при лечении различных вирусных и бактериальных заболеваний. При лечении туберкулезного воспаления рифампицин является препаратом 1-го ряда, способным воздействовать как на внеклеточные, так и внутриклеточные формы микобактерий туберкулеза. Мишенью для данного агента является РНК-полимераза бактерий. Данные о мишенях для рифампицина в соматических клетках противоречивы. Ранее было показано, что этот препарат оказывал цитотоксический эффект на клеточные культуры разного происхождения. Это свидетельствует о наличии мишеней для данного агента в соматических клетках. Актуальным остается вопрос о возможности индукции рифампицином гибели соматических клеток, так как при приеме данного препарата уход клеток в некротическую гибель может приводить к увеличению очагов воспаления при бактериальном поражении тканей организма, в то время как апоптотическая гибель клеток не будет способствовать усилению патологического процесса. Целью настоящего исследования стало изучение влияния рифампицина на пролифе-

рацию клеток эпителиального происхождения и механизмы гибели при действии данного препарата. Работу проводили на эпителиальных клетках культуры СПЭВ. В качестве экспериментальной дозы использовали дозу рифампицина 200 мкг/мл, вызывающую гибель 50 % клеток в течение 72 ч. Методами световой микроскопии и проточной цитофлуориметрии нами показано, что рифампицин вызывает снижение митотической активности клеток с последующим пролиферативным блоком в G₁-фазе клеточного цикла. Следует отметить, что блок клеточной пролиферации при действии рифампицина сопровождался увеличением ядерно-цитоплазматического соотношения и распластанности клеток, разрушением межклеточных контактов, изменением в состоянии элементов цитоскелета. Одновременно с изменениями пролиферативной активности при действии 200 мкг/мл рифампицина наблюдалась индукция апоптотической гибели клеток СПЭВ. На препаратах световой и электронной микроскопии такие клетки выявлялись по наличию характерных ядерных изменений: конденсированный хроматин, формирующий «полулуния» в ядре, или полная фрагментация ядер на плотные глыбки. Для подтверждения апоптотической гибели в клеточной культуре нами был проведен качественный анализ деградации ДНК. Результаты показали, что при действии рифампицина происходит фрагментация ДНК до олигонуклеосомного уровня, выявляемая на ДНК-электрофорезе. Для выявления механизма апоптотической гибели нами был проведен иммуноцитохимический анализ на активную форму каспазы 3. Полученные данные свидетельствуют о том, что апоптоз в клетках культуры СПЭВ как в контроле, так и при воздействии 200 мкг/мл рифампицина идет по каспазозависимому механизму. По данным литературы, существуют два основных пути активации эффекторных каспаз — рецепторный и митохондриальный. В литературе есть данные о том, что рифампицин способен вызывать повреждения в работе митохондрий. Методом электронной микроскопии нами показаны нарушения в ультраструктуре митохондрий: нарушение целостности мембран, разрушение крист, набухание и затемнения в матриксе митохондрий. Можно предположить, что такие нарушения в строении клеточного хондриома способствуют выходу проапоптотических факторов в цитоплазму и что запуск апоптоза по каспазозависимому механизму осуществляется по митохондриальному пути.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 05-04-49248) и по проекту РНП.2.1.1.7842.

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЧИВОСТИ РАЗМЕРА ГЕНОМА ЖИВОТНЫХ: ДАННЫЕ О СУЩЕСТВОВАНИИ ЭПИДОМЕНА ХРОМАТИНА РАЗМЕРОМ 1 МЛН П. Н. © Ю. М. Розанов,¹ С. Н. Литвинчук,¹ Л. Я. Боркин,¹ В. О. Чагин.¹ ¹ Институт цитологии РАН и ² Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург.

Для исследования вариабельности содержания ядерной ДНК в популяциях клеток различных животных *in vivo* применили метод прецизионной проточной цитофлуориметрии. Количество ядерной ДНК (2с) исследованных видов земноводных, рептилий и млекопитающих нахо-

дилось в диапазоне от 3 до 60 пг. После внесения поправок на влияние дробовых шумов сигнала и фона была найдена однозначная зависимость коэффициента вариации (*c. v.*) пика ДНК-распределений от размера генома (*GS*):

$$c. v. \sim [GS]^{-1/2}. \quad (1)$$

Таким образом, количество ДНК в ядре клеток в однородных клеточных популяциях является случайной величиной, для которой дисперсия (*d*) пропорциональна среднему значению самой величины. Зависимость (1) характерна для дискретных случайных величин и позволяет провести оценку уровня дискретности генома. Предполагая, что размер генома как случайная величина подчиняется распределению Пуассона, а

$$GS = \langle N \rangle \cdot a, \quad (2)$$

где $\langle N \rangle$, среднее число частиц в геноме, *a* — размер дискретной частицы, можно написать:

$$d = a^2 \cdot \langle N \rangle. \quad (3)$$

Например, для мышей линии C57BL (*GS* ≈ 6.8 пг ≈ 6700 млн п. н., *c. v.* = 1.35 %) из (2) и (3) следует: $\langle N \rangle = 1/(c. v.)^2 \approx 5500$, *a* ≈ 1.21 млн п. н.; для зеленой лягушки *Rana ridibunda* (*c. v.* = 0.9 %, *GS* ≈ 15.7 пг ≈ 15 400 млн п. н.) $\langle N \rangle = 1/(c. v.)^2 \approx 12 400$, *a* ≈ 1.25 млн п. н. Аналогичные расчеты для других животных дают диапазон размеров формирующей геном дискретной частицы примерно от 1.15 до 1.25 млн п. н. Обнаруженные закономерности позволяют представить геном как набор переменного количества доменов хроматина определенного размера. Статистический характер вариабельности размера генома может указывать на то, что такие домены хроматина проявляются как независимые единицы в процессах репликации и транскрипции, а также в эволюционном процессе.

ИНГИБИТОРЫ ЦИКЛИНЗАВИСИМЫХ КИНАЗ p21^{Waf1} и p16^{Ink4a} В СТАНОВЛЕНИИ ТРАНСФОРМИРОВАННОГО ФЕНОТИПА В E1A-экспрессирующих клетках. © В. С. Романов, Н. В. Аксенов, С. Г. Зубова, Ю. Г. Зубова, Т. В. Быкова, В. А. Поспелов, Т. В. Поспелова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, vsromanov@hotmail.com.

Ингибиторы циклинзависимых киназ p16^{Ink4a} и p21^{Waf1} и являются основными регуляторами перехода клетки из фазы G₁ клеточного цикла в фазу репликации ДНК, контролирующими инактивацию циклин-киназных комплексов CyD—Cdk4/6 и CyE/A—Cdk2. С одной стороны, известно, что p16^{Ink4a} и p21^{Waf1} негативно регулируют клеточный цикл, являются опухолевыми супрессорами и во многих типах опухолей инактивированы. С другой стороны, согласно последним литературным данным, оба ингибитора имеют альтернативные онкогенные функции, связанные с позитивной регуляцией пролиферации, ремоделингом актинового цитоскелета и супрессией апоптоза. Целью настоящего исследования было изучение роли ингибиторов циклин-киназных комплексов p16^{Ink4a} и p21^{Waf1} в становлении трансформированного фенотипа в E1A-экспрессирующих клетках. Для

этого были получены трансформанты E1A + cHa-ras из эмбриональных фибробластов мыши (MEF) дикого типа (линия mERAS) и две E1A + cHa-ras-трансформированные линии с нокаутами по генам ингибиторов p16^{Ink4a} (линия p16^{-/-}) и p21^{Waf1} (линия p21^{-/-}). Показано, что по сравнению с нетрансформированными клетками MEF все три E1A-экспрессирующие линии (mERAs, p21^{-/-} и p16^{-/-}) обладают высокой насыщающей плотностью в монослое, что свидетельствует о потере у них признака контактного торможения пролиферации, характерного для нормальных клеток. Исследуемые E1A-экспрессирующие трансформанты пролиферируют гораздо быстрее нормальных клеток, однако при низкой плотности трансформанты p21^{-/-} и p16^{-/-} пролиферируют значительно медленнее, чем клетки линии mERAs. Отсутствие p21^{Waf1} и p16^{Ink4a} в E1A-экспрессирующих клетках существенно подавляет их способность пролиферировать в клональном посеве. Трансформанты с нокаутом по ингибиторам p21^{Waf1} и p16^{Ink4a} значительно отличаются по морфологии от трансформантов, полученных из фибробластов дикого типа, по организации актинового цитоскелета. При окрашивании родамин-фаллоидином они демонстрируют способность к образованию стресс-фибрилл и фокальных контактов, что свидетельствует о важной роли ингибиторов p21^{Waf1} и p16^{Ink4a} в дезорганизации актинового цитоскелета при трансформации. Методом проточной цитометрии показано, что в отличие от нормальных клеток все три рассматриваемые трансформированные клеточные линии не способны блокировать клеточный цикл после повреждения ДНК облучением и продолжают пролиферацию. Действие цитостатика адриамина и удаление ростовых факторов из среды культивирования приводят к запуску апоптоза в E1A-экспрессирующих клетках как с нокаутами по ингибиторам циклин-киназных комплексов, так и дикого типа. Из полученных данных следует, что E1A -экспрессирующие трансформанты с нокаутами по p21^{Waf1} и p16^{Ink4a}, с одной стороны, демонстрируют свойства трансформированных клеток (высокая насыщающая плотность, короткий клеточный цикл, неспособность реализовать блоки клеточного цикла после повреждения ДНК и удаления ростовых факторов из среды культивирования), а с другой — имеют признаки, характерные для нормальных клеток (неспособность пролиферировать в клональном посеве, распластанность на субстрате и существование актинового цитоскелета). Эти данные говорят в пользу представления о возможности функционирования p21^{Waf1} и p16^{Ink4a} как онкогенов в отличие от классического представления об ингибиторах циклин-киназных комплексов как опухолевых супрессорах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 04-04-49766).

ХЕМОРЕЦЕПТОРНЫЕ КЛЕТКИ ВКУСОВОЙ ПОЧКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ. © *Р. А. Романов, О. А. Рогачевская, М. Ф. Быстрова, Р. Ф. Маргольский, С. С. Колесников.* Институт биофизики клетки РАН, Пущино, stas-kolesnikov@yahoo.com.

Основополагающими функциями периферического вкусового органа — вкусовой почки — являются распознавание вкусовых веществ, трансдукция и кодирование

информации об их концентрации и вкусовой модальности для дальнейшего анализа в соответствующих структурах мозга. На основе ультраструктурных критериев во вкусовой почке идентифицировано несколько типов клеток, включая округлые базальные, и три типа веретеновидных клеток (типы I, II и III). Предполагается, что клетки типа II являются хеморецепторными, а клетки других типов выполняют поддерживающую и секреторную функцию. В экспериментах с изолированными вкусовыми клетками морфологические критерии неприменимы, и до сего времени исследования проводились фактически на неидентифицированных клетках. Мы проанализировали статистически репрезентативную популяцию изолированных вкусовых клеток мыши (около 1000 клеток) и установили, что они могут быть однозначно распределены на три группы (А, В и С) в соответствии с их электрофизиологическими свойствами. Клетки всех трех типов представлены в трех исследованных вкусовых сосочках — желобоватом, листовидном и грибовидном, что свидетельствует об универсальности данной электрофизиологической классификации. Физиологические данные и анализ экспрессии ряда сигнальных и канальных белков свидетельствовали о том, что вкусовые клетки типа А выполняют хеморецепторную функцию. АТФ является афферентным нейротрансмиттером во вкусовой почке, и его секреция вкусовыми клетками — один из ключевых этапов вкусовой трансдукции. Мы исследовали секрецию АТФ изолированными вкусовыми клетками с использованием АТФ-биосенсора. Оказалось, что только клетки типа А способны высвобождать АТФ в ответ на их деполяризацию; этот факт также указывал на то, что они являются хеморецепторными. Секреция АТФ не зависела от внутриклеточного Ca²⁺, что свидетельствовало против экзоцитозного механизма, но в пользу АТФ-проницаемых ионных каналов как основного транспортного пути выброса АТФ. Таким образом, проведенный анализ популяции вкусовых клеток позволил сформулировать электрофизиологические критерии для идентификации истинно хеморецепторных клеток, которыми оказались клетки типа А, и выяснить, что последние используют уникальный механизм, а не классические химические синапсы для кодирования вкусовой информации.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 05-04-48203) и по программе президента РФ (грант МК-783.2007.4).

ПОЛОЖЕНИЕ АНОМАЛЬНЫХ ХРОМОСОМ В ИНТЕРФАЗНЫХ ЯДРАХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА. © *Н. Б. Рубцов,^{1, 2} Т. В. Карамышева,¹ М. А. Прохорович,¹ М. А. Лазарькова,³ С. Л. Киселев.³* ¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, rubt@bionet.nsc.ru, ² Новосибирский университет и ³ Институт общей генетики РАН, Москва.

При анализе архитектоники интерфазного ядра клеток млекопитающих было показано, что существует связь между размером хромосомы, долей активного хроматина и ее положением в интерфазном ядре. В настоящей работе проведен детальный анализ перестроенных хромосом в двух линиях эмбриональных стволовых клеток человека. Были использованы метод дифференци-

ального окрашивания хромосом и комплекс методов молекулярно-цитогенетического анализа, включающий в себя микродиссекцию метафазных хромосом человека, создание ДНК-зондов аномальных хромосом, прямой и обратный пэинтинг, многоцветный бэндинг. Было показано, что одна из аномальных хромосом представляет собой $r(18)(::p11.31 \rightarrow q21.2::q21.2 \rightarrow 11.31::)$ (сублиния hESM01r18 культуры hESM01), вторая аномальная хромосома — $der(9)(pter \rightarrow q34::q21 \rightarrow qter)$ (сублиния hESM03der(9) культуры hESM03). Были разработаны методы дифференциации нормального и перестроенного гомологов анализируемых хромосом в интерфазных ядрах эмбриональных стволовых клеток человека. Для сравнительного анализа положения нормального и перестроенного гомологов была проведена трехмерная флуоресцентная многоцветная гибридизация *in situ* (mFISH) специально подготовленных ДНК-зондов с интерфазными ядрами эмбриональных стволовых клеток соответствующих линий. Трехмерная микроскопия результатов mFISH была выполнена с помощью конфокального микроскопа LSM510META (AG Carl Zeiss) в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов Института цитологии и генетики СО РАН. Учитывая форму интерфазных ядер стволовых клеток, анализ положения территорий нормального и перестроенного гомологов хромосом 9 и 18 проводили, анализируя положение хромосом относительно ядерной мембраны и ядрышек. Было обнаружено, что реорганизация хромосом приводит к изменению их положения в пространстве интерфазного ядра.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 05-04-48221) и по программе «Генетическая и клеточная пластичность линий ЭСК человека» (госконтракт 02.512.11.2060).

ДИВЕРГЕНТНЫЙ ХАРАКТЕР ПРАЙМИРОВАНИЯ ИНСУЛИНОМ РЕСПИРАТОРНОГО ВЗРЫВА НЕЙТРОФИЛОВ. © В. Г. Сафронова. Институт биофизики РАН, Пушкино, safronova@icb.psn.ru.

Полиморфноядерные нейтрофильные гранулоциты (нейтрофилы) принадлежат к группе наиболее узкоспециализированных клеток организма. Они участвуют в реакциях врожденной иммунной системы и установления адаптивного иммунитета. Стратегия нейтрофила в обеспечении своей основной функции — защиты от бактериальных и вирусных инфекций — состоит в том, чтобы проявить максимальную активность в уничтожении патогена и оградить от повреждения ткани организма-хозяина. Такое поведение возможно при строгой координации и контроле со стороны регуляторных систем организма и внутриклеточных сигнальных систем. На основе литературных данных можно заключить, что основу функциональной пластичности нейтрофила составляют многообразие типов мембранных рецепторов и иерархические отношения на уровне сигналов, рецепторов, внутриклеточных сигнальных систем и функциональных ответов. Тем не менее в настоящее время остается не вполне понятным, какие внутриклеточные взаимодействия обеспечивают функциональную стратегию этих клеток. В исследованиях *in vivo* и *in vitro* установлено, что одним из регуляторов функций нейтрофилов

является инсулин. Его действие обеспечивается специфическим рецептором, присутствие которого было продемонстрировано на нейтрофилах человека (Fussganger et al., 1976), мыши (Сафронова и др., 2001) и крупного рогатого скота (Nielsen et al., 2003). Обнаружено, что инсулин потенцирует агрегацию нейтрофилов, хемотаксис, фагоцитоз и адгезию на клетки эндотелия кровеносных сосудов. Данные по влиянию инсулина на генерацию активных форм кислорода (АФК) довольно противоречивы, сигнальные пути рецептора инсулина в нейтрофилах охарактеризованы фрагментарно. Возможно, такая картина складывается из-за варибельности его влияния на функциональную активность клеток и сложного характера сети внутриклеточной сигнализации инсулина, как показано на инсулин-компетентных клетках. В данной работе на нейтрофилах мыши рассмотрено взаимодействие сигнальных путей рецепторов инсулина и хемотаксического пептида N-формил-Met-Leu-Phe (fMLF) в инициации респираторного взрыва, обеспечиваемого NADPH-оксидазой. Показано, что ансамбль и характер регуляции NADPH-оксидазы сигнальными компонентами зависят от количественного соотношения инсулина и fMLF при их совместном действии. Обнаружено, что праймирование респираторного взрыва инсулином осуществляется через низкоаффинные рецепторы fMLF с вовлечением тирозиновых протеинкиназ и p38 MAPK. Напротив, в случае преимущественной активации рецепторов fMLF с высоким сродством инсулин подавляет оксидазную активность. Предполагается, что дивергентный характер влияния инсулина на иницированную хемотаксическим пептидом активность NADPH-оксидазы является одним из механизмов, обеспечивающих жизненную стратегию нейтрофила.

Работа выполнена при финансовой поддержке в виде гранта НШ-2092.2006.4.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЗЕЛЕННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА (GFP) В КАЧЕСТВЕ МАРКЕРА ВЕЗИКУЛЯРНОГО ТРАНСПОРТА БЕЛКОВ ПРИ РЕАБСОРБЦИИ В КЛЕТКАХ ПРОКСИМАЛЬНЫХ КАНАЛЬЦЕВ ПОЧКИ. © Е. В. Селиверстова, М. В. Бурмакин, Ю. В. Наточин. Институт эволюционной физиологии и биохимии РАН, Санкт-Петербург, elena306@yandex.ru.

Зеленый флуоресцентный белок (GFP) был использован в качестве маркерного белка для изучения всасывания интактных чужеродных белков в организме млекопитающих (крыс) благодаря своей способности к флуоресценции только при сохранении нативной третичной структуры. После введения крысам зондом в желудок раствора GFP (0.365 мкг/мл) сегменты тонкой и толстой кишок, печени и почки были зафиксированы, заморожены и изготовлены срезы толщиной 5—10 мкм. Методом конфокальной микроскопии была выявлена специфическая флуоресценция GFP в цитоплазме клеток эпителия тонкой кишки и проксимальных канальцев почки. В эпителиоцитах проксимальных канальцев распределение специфической флуоресценции GFP имело гранулярный характер. Методом фотооксидации GFP установлено, что в этих клетках введенный белок локализован в крупных везикулярных структурах (эндосомах). Такие крупные эндосомы (до 1—2 мкм) выявляются в апикальной части цитоплазмы после введения GFP наряду с мелкими

везикулами, характерными в норме для этого типа клеток. Иммуноцитохимическим методом с использованием антител к GFP и лизосомальных маркеров установлено, что после реабсорбции белок аккумулируется в лизосомах эпителиоцитов нефрона. Таким образом, интактный GFP транспортируется через эпителий кишки трансцеллюлярно, поступает в кровь, затем фильтруется в клубочках почки в просвет нейрона и реабсорбируется клетками проксимальных канальцев путем везикулярного эндоцитоза. Полученные результаты свидетельствуют о важной роли почки в аккумуляции и последующем метаболизме чужеродных белков, поступающих в организм млекопитающих, и возможности использования GFP для изучения механизмов белкового транспорта в организме *in vivo*.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 05-04-49836), по программе «Ведущие научные школы» (проект НШ-6576.2006.4) и по программе ОБН РАН «Физиологические механизмы регуляции внутренней среды».

ПОЛУЧЕНИЕ ГЛИАЛЬНО-ОБОГАЩЕННОЙ ФРАКЦИИ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НЕЙРОКЛЕТОК ДЛЯ ВНУТРИМОЗГОВОЙ НЕЙРОТРАНСПЛАНТАЦИИ.
© В. М. Семенова, Л. Д. Любич, Л. П. Стайно, В. В. Медведев, О. Н. Величко. Институт нейрохирургии АМН Украины, Киев.

Для исследования нейрофизиологических реакций мозга на клеточную нейротрансплантацию отработана модель получения в культуре клеток монотипической глиально-обогащенной клеточной фракции (ГОФ) из ткани развивающегося мозга новорожденных кроликов. Практическая значимость такого аспекта исследований обосновывается важной ролью нейроглии в метаболическом обеспечении нейронов, в репаративной пластичности ЦНС и инициации нейроиммунных реакций. В развивающейся и зрелой ЦНС клетки макроглии принимают участие в росте нейритов, миграции нейронов, формировании ГЭБ, контроле ионного состава и в синтезе белка S-100, который транспортируется в ядра нейронов и включается в регуляцию транскрипционной активности. Глиальные факторы ускоряют дифференцировку нейронов, активируют миелинизацию их отростков и синаптогенез. Астроциты синтезируют ряд интерлейкинов, TNF- α , простагландин Е, фактор созревания глии, КСФ-1 и модулируют иммунный ответ. Предполагается ключевая роль дисфункции нейроглии в патогенезе ряда неврологических и психических заболеваний. Так, снижение способности глиоцитов выводить K^+ из межклеточного пространства является важным фактором в развитии эпилепсии. Определенное значение в эпилептогенезе имеет связанная с глией тонкая система регуляции содержания в межклеточном пространстве ГАМК и Ca^{2+} . В связи с этим нейроглии отводится важная патогенетическая роль в формировании эпилептогенного очага и судорожной готовности мозга. Большое внимание уделяется также роли индуцированного глиогенеза в восстановлении нейрональных аксонов и формировании пространственной топологической гистоархитектоники нейрональных сетей. Вышеизложенные положения определили постановку новых задач в дальнейшем изучении

биологии нейроглии, в том числе в исследовании влияния имплантации клеток глии развивающегося мозга на морфофункциональное состояние, адаптационные механизмы и отсроченные эффекты НТ в ЦНС животных-реципиентов. Работа посвящена методическим приемам получения монотипической культуры ГОФ из ткани головного мозга новорожденных кроликов для последующей нейротрансплантации. В динамике наблюдения в культурах из различных отделов головного мозга этих животных фенотипически и пространственно обнаруживается нейроглиальный тип клеточных разрастаний и моделируются условия естественного разобщения глиального и нейронального компонентов. Благодаря свойственной глиоцитам реактивности и высокой миграционной активности они рано мигрируют в зону роста в отличие от нейроцитов, переживающих на месте первичных эксплантатов и подвергающихся процессам необратимой дегенерации, лишившись глиальной поддержки. Пролиферация культивируемых глиоцитов и последующая их дифференцировка обуславливают формирование протяженных сетеобразных разрастаний с преобладанием протоплазматических и фибриллярных астроцитов на 12—14-е сут наблюдения. До 80 % клеток зоны роста культур иммуногистохимически дают положительную реакцию на кислый фибриллярный белок. Последующее механическое удаление (смывание) таких клеток и их концентрация центрифугированием способствуют осаждению более «тяжелых» остаточных тканевых фрагментов первичных эксплантатов и накоплению ГОФ в супернатанте. Через 30 сут после внутримозговой имплантации глиально-обогащенной клеточной суспензии в сенсомоторную кору мозга кроликов в ней выявляются разрастания астроцитов, что указывает на их приживление и сохранение способности к пролиферации. Проведенные эксперименты показали, что суспензия нейроцитов, полученная из культивируемых фрагментов головного мозга экспериментальных животных, обогащена астроцитами и может использоваться для их внутримозговой имплантации с целью изучения отсроченных функционально-метаболических посттрансплантационных реакций головного мозга в динамике.

ЯДЕРНЫЙ АППАРАТ ПРОСТЕЙШИХ: СТРУКТУРНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ.
© С. О. Скарлато. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, sergei_skarlato@yahoo.com.

Все простейшие являются типичными эукариотами, поскольку их генетический аппарат отделен от цитоплазмы ядерной оболочкой, а для индивидуальных хромосом характерна надмолекулярная организация. В настоящее время под «настоящими» простейшими понимаются преимущественно одноклеточные эукариоты, которые являются главным образом гетеротрофами, чаще фаготрофами; как правило, они лишены пластид и хитиновой стенки и не имеют коллагена. С учетом этих замечаний число известных науке видов Protozoa превышает 80 тыс. Среди большинства групп простейших доминируют одноядерные формы, однако дву- и многоядерные виды не являются редкостью. В последних двух случаях ядра, расположенные в общей цитоплазме, могут быть морфологически однотипными (например, у пелобиионтид) или разнотипными (например, у инфузорий). Во втором случае речь идет о ядерной дифференцировке у простей-

ших, в основе которой лежат серьезные перестройки в структурной организации хромосомного комплекса. При этом у инфузорий в клетке находятся по крайней мере два структурно и функционально различных ядра — обычно крупное соматическое ядро и более мелкое генеративное ядро. Такое состояние в клетке инфузории принято называть ядерным диморфизмом (дуализмом) или ядерным гетероморфизмом. Для 50—90-х годов прошлого столетия был характерен быстрый рост знаний по ультраструктурной цитоархитектуре ядер простейших. На основе этих данных обосновано и развито новое перспективное направление исследований — сравнительная и эволюционная кариология простейших (Райков, 1978). В рамках этого направления создана теория неоднородности структуры соматических ядер полиплоидного типа, разработано учение о происхождении и эволюции ядерного дуализма у простейших (Райков, 1992), обоснована теория, согласно которой слабая конденсация хромосом в митозе является филогенетически древним, примитивным признаком в ходе эволюции ядра (Скарлато, 2003). Показано, что у всех простейших ядро подразделяется на следующие субкомпарменты и элементы: ядерная оболочка, поровые комплексы, периферическая ядерная ламина, другие части ядерного матрикса, ядрышки, различные включения в кариоплазму и хромосомы, состоящие из хроматина. Подмечено, что многие из этих ядерных образований характеризуются у одноклеточных «животных» удивительным структурным разнообразием. Интересно отметить, что в течение многих лет это наблюдение противоречило полученному в ходе ранних ультраструктурных исследований высших эукариот представлению о слабой компарментализации и структурированности интерфазного ядра по сравнению с цитоплазмой (Spector, 2001). Отказ от упрощенного взгляда на структурно-пространственную организацию клеточного ядра произошел лишь в конце XX в., когда в результате расширения методической базы сначала у млекопитающих, а затем и у других эукариотных организмов были выявлены и охарактеризованы новые внутриядерные структуры и специализированные области: ядерные «крупинки» (nuclear speckles/IGCs); полиядерные белковые тельца (PcG bodies), сайты транскрипции, домены локализации транскрипционных факторов (Oct1/PTF/transcription domains), тельца Кахала (Cajal bodies) или «скрученные» тельца (coiled bodies), снурпосомы, «близнецы» телец Кахала, перинуклеолярный компармент (PNC); ядерное тело SAM68, расположенное на поверхности ядрышка, ядерные тельца PML и др. (Gall, 2000; Misteli, 2001). У простейших современные исследования аналогичных ядерных структур и новых внутриядерных доменов только начинаются. В последнее десятилетие XX в. на развитие сравнительной кариологии эукариотных микроорганизмов большое влияние оказала так называемая молекулярная революция, которая наложилась на еще далеко не исчерпавшую себя «цитологическую революцию». Ядро является главным компарментом клетки простейшего, где локализуется почти весь ее геном. В нем осуществляются репликация и транскрипция большинства молекул ДНК, которые, как правило, входят в состав хромосом. Установлено, что у многих простейших хромосомы относительно короткие. Их молекулы ДНК могут быть фракционированы целиком с помощью пульс-электрофореза, что служит одним из немногих прямых доказательств линейности хромосомных ДНК. Показано, что организация ядерных генов

и геномов простейших в целом соответствует таковой у других эукариот. Как правило, в хромосомных ДНК этих дотканевых существ происходит чередование уникальных и повторяющихся последовательностей. Среди последних обнаружены слабоповторяющиеся (менее 50 копий), умеренноповторяющиеся (сотни копий) и высокоповторяющиеся (тысячи и десятки тысяч копий) последовательности, которые могут образовывать тандемные и инвертированные повторы. Помимо генов молекулярной хромосомной ДНК содержатся другие сегменты, например центромерные и теломерные последовательности. Особенно поражает сходство в структурной организации рибосомных генов у простейших и других эукариот. В современной протистологии сравнительный анализ этих и других сегментов ДНК широко используется для молекулярно-филогенетических построений. Таким образом, молекулярная структура многих генетических элементов неплохо исследована у значительного числа видов простейших. Однако остаются нерешенными проблемы, связанные с определением общих принципов структурной организации и функционирования генома у этих эукариот. Успехи в данной области наметились только в самое последнее время в связи с работой по расшифровке ядерных геномов некоторых простейших. Таким образом, к началу XXI в. стало очевидным, что для понимания общих принципов организации ядра простейших, изучения структурного разнообразия и генетической пластичности этого главного компартамента клетки дотканевых эукариот необходим синтетический подход, основанный на разумном сочетании современных морфологических, электронно-микроскопических и молекулярно-биологических подходов. Практика показывает, что решить эту задачу лучше других могут именно протозоологи, которые традиционно относятся к клетке простейших прежде всего как к организму, а не просто как к источнику разнообразных биомолекул для исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-00662).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЗЕЛЕННОГО ФЛУОРЕСЦИРУЮЩЕГО БЕЛКА (EGFP) В ЭМБРИОГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ РАННИХ ЗАРОДЫШЕЙ МЫШЕЙ. © А. А. Смирнов,¹ Н. В. Шишова,² Н. Ю. Сахарова,¹ Е. Ф. Вихлянцева,¹ Г. А. Давыдова,¹ Б. К. Гаврилюк.¹
¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, davidova_g@mail.ru, и ² Институт биофизики клетки РАН, Пушкино.

Применение белка EGFP перспективно для исследований доимплантационного эмбриогенеза млекопитающих, в частности для выяснения особенностей клеточных взаимодействий и судьбы потомков ранних бластомеров. Для использования EGFP в таких работах необходимо знать особенности его синтеза в зародышах, определяемые прежде всего тем, кто из родителей был носителем гена *EGFP*. Мы изучали экспрессию этого гена в ранних зародышах, полученных от гетерозиготных самок или самцов мышей линии C57BL/6-TgN(ACTb-EGFP) при скрещивании с мышами C57BL/6. Трансгенные мыши, несущие ген-репортер, кодирующий синтез EGFP под контролем актинового про-

мотора цыпленка, были получены из Научного центра биомедицинских технологий РАМН. Была изучена локализация EGFP в зрелых ооцитах и зародышах на последовательных стадиях доимплантационного развития — от стадии зиготы до стадии бластоцисты. Ооциты выделяли из яйчников через 48 ч после инъекции СЖК. Зародышей получали из яйцеводов и рогов матки. Прижизненные исследования проводили с помощью микроскопа Axioscop 40FL (Zeiss, Германия). Анализ эмбрионального материала, полученного от гетерозиготных самок, несущих ген *EGFP*, показал, что специфическое свечение белка характерно для всех изученных объектов: от зрелого ооцита до зародышей на последней стадии доимплантационного развития — бластоцисты — вплоть до их вылупления из *Z. pellucida*. При использованном виде скрещивания лишь часть зародышей несет ген зеленого белка, а специфическое его свечение обнаружено у всех исследованных зародышей, так же как и в неоплодотворенных ооцитах. Это означает, что синтезированный в ооцитах белок EGFP сохраняется в зародышах в нативном состоянии независимо от их собственного генома в течение всего доимплантационного периода. При исследовании зародышей, полученных от скрещивания с самцами, в геноме которых находится ген *EGFP*, было показано, что его экспрессия начинается на 8-клеточной стадии в процессе компактизации. Специфическое свечение зеленого белка было обнаружено у половины исследованных на этом сроке зародышей (7 из 13). Такое соотношение «светящихся» и «несветящихся» зародышей (1 : 1) совпадает с теоретическим, менделевским, расщеплением признаков, которое можно было ожидать при использованном виде скрещивания. Это показывает, что обнаруженное нами свечение зародышей действительно связано с началом экспрессии собственного гена *EGFP*, переданного с отцовским набором хромосом. Эта экспрессия запаздывает по сравнению с началом основной активности генома зародыша, которое происходит на 2-клеточной стадии. На стадии бластоцисты свечение зеленого белка также наблюдается лишь у части зародышей. Таким образом, наши наблюдения показали, что EGFP, синтезируемый в период оогенеза у гетерозиготных самок, сохраняется у зародышей независимо от их собственного генома в течение всего доимплантационного периода. Он может служить витальным маркером при прослеживании судьбы отдельных бластомеров в опытах по созданию химерных зародышей. Собственная экспрессия гена *EGFP* начинается в процессе компактизации на 8-клеточной стадии. Для использования зародышей, полученных от скрещивания с трансгенными самцами, в качестве доноров «зеленых клеток» или реципиентов необходим их предварительный отбор под контролем флуоресцентного микроскопа.

ВНУТРИХРОМОСОМНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК ГЕНОМОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ, СОДЕРЖАЩИЕ «ТЕЛОМЕРНЫЕ» ТАНДЕМНЫЕ ПОВТОРЫ (TTAGGG)_n. © А. Н. Смирнова, М. П. Светлова, Л. В. Соловьева, О. С. Мудрак, Р. И. Крутилина, Н. В. Томилиш. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Геномы высших эукариот содержат много избыточной ДНК, роль которой остается неясной. Основная масса этой ДНК метилирована по CpG и поэтому плохо транскрибируется и быстро мутирует за счет дезамини-

рования метил-CpG в TpG, однако в хромосомах позвоночных животных имеются длинные тандемные повторы (TTAGGG)_n, которые не содержат CpG и не могут быть метилированы. Эти повторы, которые ввиду простоты последовательности нуклеотидов не могут содержать кодирующих белок генов, могут локализоваться в теломерах, где они выполняют функцию кепирования концов хромосом, однако у примерно 40 % видов позвоночных указанные повторы находятся также и внутри хромосом. В геноме китайского хомячка эти внутривнутрихромосомные повторы (TTAGGG)_n (ВХТП) составляют около 5 % всей ДНК, часто локализуются в прицентромерных районах хромосом и могут связывать теломерный белок TRF1. Эволюционное происхождение ВХТП неясно, они могут образоваться при теломерных слияниях хромосом, а также при интеграции эписомной (кольцевой) (TTAGGG)_n ДНК по двойным разрывам в хромосомах. Неизвестно, происходит ли транскрипция ВХТП, но если происходит, она, очевидно, не может быть подавлена метилированием ДНК. Хроматин, покрывающий ВХТП, может, однако, содержать репрессивные модификации гистонов, такие как гистон H3, триметилированный по лизину-9 (H3-K9m3) или по лизину-27 (H3-K27m3), характерные для конститутивного и факультативного гетерохроматина соответственно. Мы исследовали ВХТП в клетках китайского хомячка с помощью экспрессии в них теломерного белка человека TrpG, меченного зеленым флуоресцентным белком (GFP). Этот белок специфически связывает повторы (TTAGGG)_n как на теломерах, так и внутри хромосом, но в иммортализованных клетках CHO или V79, имеющих очень короткие теломеры, в интерфазных ядрах видны только большие блоки ВХТП, связывающие GFP-TRF1. Это связывание — динамическое, и с помощью анализа кинетики восстановления флуоресценции после фотовыщечивания (FRAP) мы определили, что в связанном состоянии молекула GFP-TRF1 находится в среднем примерно 15 с, причем обменивается более 90 % всех молекул. Через 2—4 ч после обработки клеток ингибитором транскрипции актиномицином Д (но не ингибитором белкового синтеза циклогексимидом) мобильность GFP-TRF1 резко уменьшается. Это согласуется с гипотезой о том, что обмен GFP-TRF1 происходит во время транскрипции ВХТП. Поэтому мы проверили, не совпадают ли ВХТП в живых клетках китайского хомячка с центрами включения 5-бромуридинтрифосфата (бром-УТФ), однако выявить такое совпадение не удалось, хотя некоторое перекрытие участков включения бром-УТФ и ВХТП было обнаружено. С использованием ПЦР в реальном времени мы также проверили интенсивность транскрипции некоторых уникальных генов, расположенных в геноме рядом с повторами (TTAGGG)_n. Оказалось, что некоторые из этих генов активно транскрибируются; таким образом, повторы (TTAGGG)_n сами по себе не являются глушителями транскрипции. Для изучения вопроса о том, не содержат ли ВХТП репрессивные модификации гистонов, мы использовали для окрашивания интерфазных ядер и метафазных хромосом клеток китайского хомячка специфические антитела к H3-K9m3 или H3-K27m3 и выяснили, что распределение этих модификаций гистонов в ядрах и хромосомах совершенно иное, чем распределение ВХТП. Таким образом, эти блоки не содержат хроматиновых маркеров конститутивного или факультативного гетерохроматина. Как было подчеркнуто выше, ДНК ВХТП не может быть

метирирована, поскольку не содержит CpG и, подобно теломерам, динамически связывает GFP-TRF1, причем обмен этого белка как-то зависит от транскрипции. Возможно, что ВХТП представляют собой новый тип активного гетерохроматина, который поддерживается за счет транскрипции и образования малых РНК, но его функции остаются неизвестными.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проекты 07-04-48897 и 07-04-00311) и ассоциацией AS (грант ИНТАС-ГЕНОМИКА 05-1000004-7753).

КЛЕТОЧНЫЕ ИСТОЧНИКИ РАЗВИТИЯ ЗОНЫ ПАРАТОМИИ У ОЛИГОХЕТЫ *Pristina longiseta* (Naididae): КЛОНИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ-МАРКЕРОВ СТВОЛОВЫХ И МАЛОДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК. © Н. П. Смирнова, Р. П. Костюченко. Кафедра эмбриологии С.-Петербургского государственного университета, kostyuch@mail.ru.

Бесполое размножение по типу паратомии, т. е. поперечного деления, при котором формирование недостающих головных и хвостовых отделов предшествует разделению вновь образованных зооидов, характерно для олигохет семейства Naididae. При развитии зоны паратомии происходят значительные клеточные и тканевые перестройки. Зона деления (перетяжка) закладывается посередине сегмента. В ее развитии мы выделяем три стадии, различающиеся степенью дифференцировки структур дочерних зооидов, — ранняя, средняя и поздняя перетяжки. У изучаемой нами олигохеты *Pristina longiseta* образуются цепочки, состоящие из нескольких разновозрастных зооидов (не более 4), при этом каждая следующая зона деления закладывается в сегменте, лежащем впереди предыдущей. При изучении бесполого размножения особый интерес представляет вопрос о клеточных источниках формирования недостающих структур новых зооидов. Ранее нами были получены данные (Харин и др., 2006), позволяющие предположить, что клеточным источником зоны деления являются клетки покровного эпителия, подвергнувшиеся в процессе развития зоны паратомии дедифференцировке. Для проверки этого предположения мы клонировали фрагменты генов-маркеров малодифференцированных и стволовых клеток *Plo-vasa*, *Plo-pl10* и двух гомологов *piwi* для олигохеты *P. longiseta* и исследовали их экспрессию методом гибридизации *in situ* на целых объектах. Экспрессия генов *Plo-vasa*, *Plo-pl10* выявляется уже на самых ранних стадиях развития перетяжки, когда никаких морфологических признаков закладки зоны деления еще не наблюдается. Домены экспрессии расположены в покровном эпителии по бокам животного посередине сегмента и имеют вид двух симметричных узких поперечных полосок клеток. По мере развития перетяжки сигнал усиливается, а область экспрессии быстро увеличивается, переходя на дорсальную сторону, и уже на стадии средней перетяжки охватывает весь покровный эпителий зоны деления и клетки бластемы. В цефалогенной, т. е. формирующей новую голову, части заднего зооида сигнал распространен обширно, но диффузно, в то время как в соматогенной части, формирующей новую зону роста переднего зооида, он носит более компактный и интен-

сивный характер с максимумом на дорсальной и дорсолатеральных сторонах. На стадии поздней перетяжки экспрессия генов *Plo-vasa*, *Plo-pl10* отмечена в надглоточном ганглии формирующейся головы, в то время как в сформированной голове отмечена лишь умеренная экспрессия *Plo-pl10*. На этой стадии обнаружен сигнал и в кишечнике: для *Plo-pl10* в пределах одного-двух сегментов, следующих за цефалогенной частью заднего зооида, а для *Plo-vasa* — в области второго старого сегмента, следующего за цефалогенной частью. Из двух клонированных нами гомологов гена *piwi* на сегодняшний день мы изучили паттерн экспрессии *Plo-piwiA*. Этот ген обнаруживает довольно слабый сигнал в покровах и, возможно, во внутренних тканях зоны деления с более интенсивным и протяженным доменом на дорсальной стороне. Но в противоположность генам *Plo-vasa*, *Plo-pl10* паттерн экспрессии *Plo-piwiA* охватывает почти весь сегмент, образующий перетяжку, на всех стадиях бесполого размножения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-49030-а).

ЛИДИРУЮЩАЯ РОЛЬ МИКРОТРУБОЧЕК В БАРЬЕРНОЙ ДИСФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ: РАЗБОРКА ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ МИКРОТРУБОЧЕК ПРЕДШЕСТВУЕТ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РЕОРГАНИЗАЦИИ ЦИТОСКЕЛЕТА. © К. М. Смурова,¹ А. А. Бирюкова,² А. Д. Верин,³ И. Б. Алиева.¹ ¹ Институт физико-химической биологии Московского государственного университета, irina_alieva@belozersky.msu.ru, ² Отдел пульмонологии и неотложной медицины, Университет г. Чикаго, США, и ³ Центр сосудистой биологии, Медицинский колледж Джорджии, Агаста, Джорджия, США.

Эндотелий сосудов представляет собой селективный проницаемый барьер между кровью и внутренним пространством всех органов и принимает участие в регуляции транспорта макромолекул и движении клеток крови сквозь стенку сосуда. Поддержание барьерной функции обеспечивается равновесием внутриклеточных сокращающих и растягивающих сил, генерируемых белками цитоскелета. Барьерная дисфункция эндотелиального пласта, выстилающего стенки кровеносных сосудов, характеризуется значительной перестройкой цитоскелета клеток, активацией актомиозинового сокращения и в конечном итоге — образованием промежутков между эндотелиальными клетками. В настоящее время роль микротрубочек в регуляции барьерной функции эндотелия остается до конца не выясненной, однако клинические наблюдения показывают, что реакция со стороны микротрубочек является крайне важным звеном в развитии дисфункции эндотелия — внутривенное введение противораковых препаратов, обладающих антитубулиновым действием, может приводить к развитию отека легкого у онкологических больных. В данной работе исследовали изменения, которым подвергается система микротрубочек в процессе барьерной дисфункции. В большинстве эндотелиальных клеток легочной артерии человека плотность микротрубочек наиболее высока в центре клетки, в районе centrosомы и незначительна у клеточного края, тогда как система актиновых филаментов представлена тонкими пучками, локализованными преимущественно

на периферии клетки. Анализ распределения микротрубочек методом измерения интенсивности их флуоресценции после окраски специфическими антителами показал, что в норме в клетках эндотелиального пласта снижение интенсивности флуоресценции от центра клетки к ее периферии описывается уравнением экспоненциальной регрессии. Гормон тромбин (25 нМ) вызывает дисфункцию эндотелиального барьера, сопровождающуюся быстрым снижением количества периферических микротрубочек и реорганизацией системы микротрубочек во внутренней цитоплазме клетки (падение интенсивности флуоресценции описывается уравнением линейной регрессии уже через 5 мин после начала воздействия), при этом формирование актиновых стресс-фибрилл происходит позднее (максимальная плотность стресс-фибрилл достигается через 30 мин воздействия тромбина). То, что ответ со стороны актиновой сети развивается значительно позже, чем происходит деполимеризация микротрубочек, позволяет утверждать, что снижение количества микротрубочек на краю клеток вызвано именно деполимеризацией микротрубочек, а не тем, что рост микротрубочек в этом районе механически ограничивается внутренними препятствиями (например, плотными краевыми пучками актиновых филаментов). Оба эффекта обратимы — через 60 мин после начала воздействия сеть микротрубочек не отличается от нормальной, а следовательно, фибриллярные системы цитоскелета способны адаптироваться к воздействию естественного регулятора тромбина. Реакция со стороны микротрубочек развивается быстрее, чем реорганизация системы актиновых филаментов, ответственных за последующие изменения формы эндотелиальной клетки в ходе дисфункции. Таким образом, полученные нами данные демонстрируют лидирующую роль микротрубочек в развитии барьерной дисфункции эндотелия — микротрубочки, по-видимому, являются первым эффекторным звеном в цепи реакций, приводящих к барьерной дисфункции эндотелия сосудов.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной в виде грантов НИН (HL06730 и HL58064) и Российским фондом фундаментальных исследований (проект 06-04-49233).

МИКРОДИССЕКЦИОННЫЕ ДНК-ЗОНДЫ В ИЗУЧЕНИИ В-ХРОМОСОМ КОПЫТНОГО ЛЕММИНГА *Dicrostonyx torquatus torquatus* ПОЛЯРНОГО УРАЛА. © О. И. Солдаткина,¹ Т. В. Карамышева,¹ Н. Б. Рубцов,¹ Э. А. Гилева.² ¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, osoldatkina@gmail.com., и ² Институт экологии растений и животных Уральского отделения РАН, Екатеринбург.

Добавочные хромосомы, или В-хромосомы, у копытных леммингов *Dicrostonyx torquatus torquatus* из популяции Полярного Урала обнаруживаются у всех изученных животных, их число варьирует от 5 до 16. В предыдущих исследованиях добавочных хромосом данного вида, проведенных в лаборатории Э. А. Гилевой, выполненных при помощи традиционных цитогенетических методов, были подробно описаны их частоты в природных популяциях, морфологические особенности, поведение в митозе и мейозе, фенотипический эффект, оказываемый ими на организм «хозяина», а также была выяв-

лена их гетерохроматиновая природа. Для изучения организации и происхождения добавочных хромосом нами методом микродиссекции метафазных хромосом были получены ДНК-библиотеки целых В-хромосом. Каждая ДНК-библиотека представляла собой материал лишь одной В-хромосомы, амплифицированной с помощью ПЦР с частично вырожденными праймерами (DOP-PCR). В дальнейшем ДНК-библиотеки метились в дополнительных циклах ПЦР и использовались в качестве ДНК-зондов для флуоресцентной гибридизации *in situ*. Картины гибридизации всех ДНК-зондов с В-хромосомами исследованных нами животных были сходны. Кроме того, эти зонды метили прицентромерные районы некоторых аутосом. При использовании метода флуоресцентной гибридизации *in situ* с комбинированием ДНК-зондов, представленных рибосомальной ДНК, и микродиссекционных ДНК-зондов В-хромосом нами была показана локализация генов рРНК не только в прицентромерных районах аутосом и половых хромосом, но и в некоторых В-хромосомах животных вида *D. t. torquatus*. На основании этих данных обсуждается гипотеза о внутривидовом происхождении основной части материала добавочных хромосом.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-48230-а).

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕТЕРОГЕННОЙ ПОПУЛЯЦИИ ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ КЕРАТИНОЦИТОВ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НА РАЗНЫХ БЕЛКАХ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА. © О. Г. Спичкина, М. И. Блинова, Г. П. Пинаев. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

При получении кератиноцитов из кожи человека выделяется гетерогенная популяция, состоящая преимущественно из клеток базального слоя, среди которых выделяют стволовые и транзиторные кератиноциты. Эти клетки обладают более высокой аффинностью к отдельным белкам внеклеточного матрикса, представленным в базальной мембране, по сравнению с более дифференцированными клетками (Watt, Hertle, 1994; Radu et al., 2002; Kim et al., 2004, и др.). Задачей настоящей работы было выделить и затем охарактеризовать субпопуляции кератиноцитов, отселектированных по адгезии к некоторым белкам внеклеточного матрикса за короткие сроки (10, 20 и 30 мин), и проверить, влияют ли на культивируемые клетки предложенные им субстраты. Условия культивирования клеток, в частности субстрат, на котором они растут и который отчасти они сами и вырабатывают, в значительной мере способствуют проявлению функциональной активности клеток. В качестве субстратов были использованы коллагены I и IV типов и фибронектин. Характеризовали клетки по двум параметрам — площади проекции клетки на подложку и коэффициенту распластанности (Kuzminykh, Petrov, 2004). Клетки анализировали через 1 сут после посева. К этому времени они, адаптируясь, теоретически уже должны синтезировать собственный внеклеточный матрикс. Результаты нашей работы показывают, что и через 1 сут можно обнаружить статистически достоверные различия клеток по всем исследуемым параметрам в зависимости от субстрата, на котором их культивируют, что ранее было отме-

чено у мезенхимных клеток (Petrov et al., 2007). В результате показано, что клетки можно условно разделить на две субпопуляции — «мелкие круглые» и «крупные распластаные» клетки при культивировании их на субстратах коллагенов I или IV типа. Однако при использовании фибронектина таких субпопуляций не обнаруживается. Вероятно, оба коллагена, по-видимому, оказывают специфическое влияние на исследуемые характеристики кератиноцитов в отличие от фибронектина, на котором клетки не проявляют каких-либо особенностей даже при селекции их по времени адгезии. Не исключено, что такое поведение кератиноцитов в культуре отражает их взаимодействие с данными белками и в условиях *in vivo*.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Министерством образования и науки (ЛОТ-2005-ЖС-13.1/001), в виде гранта президента РФ по программе поддержки научных школ (НШ-1244.2003.4) и в виде гранта правительства Санкт-Петербурга для студентов и аспирантов в 2006 г.

ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА НА РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СУБЪЕДИНИЦЫ P65 ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА NF-κB И α-AKТИНИНА-4 В ЯДРЕ КЕРАТИНОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА. © О. С. Спичкина,¹ М. Г. Хотин,¹ А. В. Соловьева,² Д. Г. Тентлер,¹ Л. В. Туроверова,¹ М. И. Блинова,¹ Г. П. Пинаев.¹ ¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и ² С.-Петербургский государственный университет.

NF-κB — транскрипционный фактор, который регулирует экспрессию ряда жизненно важных генов. В клетке он находится преимущественно в виде гетеродимеров p65/p50 и гомодимеров p65/p65. На клетках эпидермоидной карциномы кожи человека A431 показано, что субъединица p65 транскрипционного фактора NF-κB связывается с α-актинином-4, который является одним из актинсвязывающих белков, в цитоплазме и при стимуляции идет с ним ядро (Ara et al., 2000). По литературным данным, актиновый цитоскелет участвует в перераспределении p65 при адгезии на различные белки внеклеточного матрикса (ВКМ). Целью данной работы было исследование влияния белков ВКМ (коллагена I и IV типов, фибронектина и ламинина 2/4), а также матригеля на распределение p65-субъединицы транскрипционного фактора NF-κB и α-актина-4 в кератиноцитах кожи человека. Клетки, выращенные на лигандах, сначала подвергали стриппингу, т. е. снимали верхние слои дифференцированных клеток, затем снимали слой базальных клеток и отдельно их анализировали. Было показано, что содержание α-актина-4 в комплексах с p65, выделенных из ядерных фракций, в базальных и дифференцированных клетках, культивируемых на различных лигандах, различается. В результате морфологических исследований базальных кератиноцитов выявлено, что предложенные клеткам белки ВКМ влияют на перераспределение p65 и α-актина-4 в клетке. В основном эти белки равномерно распределены по клетке. Однако в кератиноцитах, выращенных на фибронектине, p65 в основном представлен в ядре, а α-актинин-4 распределен повсеместно, особенно выделяются яркие скопления в ламеллах, тогда как у клеток, выращенных на матригеле, содержание p65 и α-актина-4 значительно меньше. Методом ОТ-ПЦР проводили анализ экспрессии в клет-

ках эпидермоидной карциномы человека, культивируемых на коллагене 1, фибронектине и ламинине 2/4, следующих генов-мишеней p65-субъединицы NF-κB: *Bax*, *Snail*, *Tenascin-C*, *ICAM*, *Fn* и *FGF*. Показана зависимость активности этих генов от типа белка внеклеточного матрикса, на котором культивировались клетки. Активация экспрессии гена *Bax* на фибронектине совпадает во времени с увеличением содержания α-актина-4 в ядре, что позволяет предположить участие этого белка в регуляции активности транскрипционного фактора NF-κB. Предполагается, что количество α-актина-4 в комплексах с p65 может отражать влияние белков внеклеточного матрикса на физиологическое состояние этих клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке президиума РАН по программе «Молекулярная и клеточная биология».

МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ УЧАСТКОВ ПРИКРЕПЛЕНИЯ ХРОСОМОМ К ЯДЕРНОЙ ОБОЛОЧКЕ У МАЛЯРИЙНЫХ КОМАРОВ. © В. Н. Стегний, А. О. Сайджафарова, Г. Н. Артемов. Томский государственный университет, stegniy@res.tsu.ru.

Политенные хромосомы трофоцитов яичников малярийных комаров *Anopheles* являются удобной моделью для изучения структурно-функциональной и пространственной организации генома эукариот. При помощи метода микродиссекции политенных хромосом с последующей *in situ*-гибридизацией изучены особенности хромосомной локализации районспецифичного ДНК-зонда из прицентромерного участка гетерохроматина хромосомы 2L *Anopheles beklemishevi* на политенных хромосомах *A. atroparvus*, *A. messeae* и *A. beklemishevi*. Установлено, что последовательности ДНК, гомологичные зонду, присутствуют у всех видов в прицентромерных участках и районах прикрепления на хромосомах 2 и 3, кроме участков прикрепления хромосом XL *A. beklemishevi* и *A. messeae*, прицентромерной области 2R у *A. messeae*. α-Гетерохроматин хромосом центромерных участков 2L *A. messeae* и 3R и 2R также не содержит гомологичных зонду ДНК-последовательностей. Результаты были сопоставлены с полученными ранее данными по локализации видоспецифичного зонда из участка хромосомы 2R *A. atroparvus* на хромосомах видов *A. atroparvus*, *A. messeae* и *A. beklemishevi* (Грушко и др., 2004). Выявленные различия в местах локализации зондов и интенсивности свечения указывают на наличие индивидуального сочетания последовательностей в районах прикрепления хромосом. XL-хромосома *A. messeae* прочно крепится к ядерной оболочке латеральным районом 2b/c, который имеет морфологию, характерную для участков β-гетерохроматина (Стегний, 1993). Этот район имеет последовательности ДНК, гомологичные прицентромерному участку 2R хромосомы *A. atroparvus* (Грушко и др., 2004), и не имеет гомологии ДНК с прицентромерным районом 2L хромосомы *A. beklemishevi* (Сайджафарова и др., 2006). Методом микродиссекции политенных хромосом выделили участок 2b/c XL-хромосомы *A. messeae*. С помощью флуоресцентной гибридации *in situ* провели анализ гомологии ДНК исследуемого района с политенными хромосомами *A. messeae*. Самую большую ин-

тенсивность имел сигнал в районе 2b/c XL-хромосомы, откуда был взят зонд. Другие участки этой хромосомы не обнаружили метки. На хромосоме 2 метка выявлена в прицентромерном районе правого плеча 15d, а также в латеральных районах обоих плеч. Хромосома 3R помечалась в прицентромерном районе 32d и латеральных районах. На хромосоме 3L сигнал был обнаружен в прицентромерном районе 33a-c, латеральных районах, слабый сигнал был выявлен в теломерном участке.

Авторы выражают благодарность Н. Б. Рубцову и Т. В. Карамышевой за участие в проведении работы.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проекты 06-04-96965 и 07-04-10047), по программе «Ведущие научные школы РФ» (грант НШ-4283.2006.4) и по целевой программе «Развитие научного потенциала высшей школы (2006—2008 гг.)» (грант РНП.2.2.1.1.2038).

РОЛЬ МИКРОТРУБОЧЕК И ЦЕНТРОВ ИХ ОРГАНИЗАЦИИ В ФОРМИРОВАНИИ УСТОЙЧИВОСТИ К ИЗОПРОПИЛ-N-ФЕНИЛКАРБАМАТУ У МУТАНТОВ *Nicotiana sylvestris*. © О. А. Стельмах, А. И. Емец, Я. Б. Блюм. Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, alyemets@mail.univ.kiev.ua.

Фенилкарбаматные гербициды, наиболее распространенными из которых являются изопропил-N-фенилкарбамат (ИФК) и хлоризопропил-N-фенилкарбамат (ХИФК), представляют собой антимитотические агенты, которые воздействуют на центры организации микротрубочек (ЦОМТы) и (либо только) на микротрубочки (МТ). Механизмы действия данных веществ по-прежнему остаются предметом научной дискуссии, поскольку существуют доказательства, например, того что ХИФК нарушает функционирование только ЦОМТов, а не МТ, приводя к фрагментации полюсов и формированию трех- либо многополюсных веретен деления (Lloyd, Traas, 1988). Другие данные демонстрируют, что мишенью действия ХИФК являются исключительно МТ (Eleftheriou, Bekiarj, 2000). Более того, на клетках суспензионной культуры табака было установлено, что ХИФК наиболее вероятно связывается с β -тубулином в сайте связывания бензамидов (Young, Lewandowski, 2000). Что касается механизма действия ИФК, то на сегодняшний день существуют только данные о том, что это вещество не оказывает влияния ни на полимеризацию тубулина из мозга *in vitro* (Bartels, Hilton, 1973; Cosset et al., 1975), ни на сборку растительных МТ *in vivo* (Bartels, Hilton, 1973). Наиболее типичными симптомами, которые ИФК вызывает, является образование трех- и мультиполярных полюсов. Для более глубокого выяснения механизма действия ИФК на растительные клетки нами были отселектированы *in vitro* мутантные линии *Nicotiana sylvestris* (Yemets et al., 2003), устойчивые к действию 30 мкМ ИФК. Было установлено, что полученные мутанты *N. sylvestris* обладали более низким уровнем чувствительности к нокодазолу (соединению из класса бензимидазолов, деполимеризующему МТ), тогда как в клетках контрольной линии после обработки нокодазолом наблюдался в 2—3 раза более высокий процент нарушений

метафаз, анафаз и телофаз. В клетках контрольной линии нокодазол в концентрации 100—500 мкМ индуцировал тотальную фрагментацию ДНК на всех стадиях клеточного цикла, включая интерфазу, тогда как у мутанта при любых концентрациях, используемых нами в эксперименте, фрагментации ДНК не наблюдалось вообще (Yemets et al., 2005). Иммунофлуоресцентный анализ с использованием специфических моноклональных антител к α - и γ -тубулину показал, что и МТ, и ЦОМТы в клетках мутантов *N. sylvestris* не разрушаются после обработки 30 мкМ ИФК, тогда как в клетках контрольной линии наблюдалось сохранение интактной структуры кортикальных МТ при одновременном формировании многополюсных веретен деления и разветвленных фрагментов. ЦОМТы после обработки мутантов гербицидом не разрушались, а располагались характерно для растительных клеток в примембранной области и на периферии ядра, тогда как в клетках контрольной линии локализация ЦОМТов была нарушенной. Полученные данные еще раз подтверждают вывод о том, что мишенью действия ИФК являются сайты нуклеации МТ, а не непосредственно сами МТ. Хотя признак устойчивости к ИФК стабильно экспрессировался в клетках полученных линий *N. sylvestris*, при проведении генетического анализа сложно было установить тип мутации из-за отсутствия у них фертильности. Инфертильность была следствием продукции недоразвитых семян. Мутанты характеризовались определенной депрессией в развитии, выраженной в уменьшении габитуса и размеров вегетативных и генеративных органов, полустерильностью пыльцы, которая была обусловлена нарушениями в ходе микроспорогенеза. Низкая семенная продуктивность у поколения F₁, как было установлено, обуславливалась высокой стерильностью пыльцы ($84.51 \pm 0.71\%$) и пониженной жизнеспособностью семянпочек (Стельмах и др., 2005; Yemets et al., 2005). При проведении теста на устойчивость к ИФК (1-месячное культивирование в присутствии 30 мкМ ИФК) жизнеспособных семян поколений F₁ и F₂, полученных при самоопылении, было установлено, что резистентностью к ИФК в данных условиях обладало примерно 4 % семян.

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ И АНАЛИЗ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ДОМЕНА ХРОМОСОМЫ 4 СВИНЬИ НА ПРЕПАРАТАХ РАСТЯНУТОГО ХРОМАТИНА. © В. Н. Стефанова. ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных РАСХН, Санкт-Петербург—Пушкин, vestefan@mail.ru.

Хромосомный пэинтинг — современный эффективный метод, который широко используется в цитогенетических исследованиях как для изучения структурной организации интерфазных доменов хромосом и пространственной архитектоники интерфазного ядра, так и для сравнения геномов далеких видов. В настоящей работе была получена пэинтинговая проба короткого плеча хромосомы 4 домашней свиньи (4p) с помощью методов микродиссекции этого района хромосомы и последующей ПЦР-амплификации ДНК с использованием частично вырожденного праймера (DOP-PCR). Специфичность этой пробы была подтверждена на метафазных пластинках хромосом свиньи в экспериментах по флуоресцентной гибридизации *in situ* (CISS-вариант). В дальнейшем

полученная пэйнтинговая ДНК-проба была использована для визуализации домена хромосомы 4 свиньи на 2D-препаратах растянутого хроматина ФГА-стимулированных лимфоцитов крови свиньи, обработанных неионным детергентом Тритоном X-100. Изучали расположение и структуру доменов хромосомы 4 на стадиях интерфазы, профазы и прометафазы (лимфоциты не подвергали воздействию колхицина и гипотонического раствора). Гомологичные домены короткого плеча хромосомы 4 выявляли обычно на периферии ядра, причем на стадии интерфазы и профазы домены были расположены симметрично относительно центральной оси ядра. Выделено несколько основных морфотипов доменов хромосомы 4 на основе их структурно-морфологических особенностей. В прометафазе взаиморасположение доменов хромосомы 4 варьировало от ядра к ядру, а сами домены были представлены полиморфными сложно организованными структурами, состоящими из многочисленных последовательно расположенных хромомеров. Полученные данные сопоставляются с литературными данными по пространственной организации хромосомных доменов на 3D-препаратах.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Шведским институтом (Sweden Institute).

ДИГИДРОКВЕРЦЕТИН — ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В МЕДИЦИНЕ И БИОТЕХНОЛОГИИ. © Т. В. Суханова,^{1,2} И. И. Селезнева,² Г. А. Давыдова,² М. Г. Фомкина.² ¹ Пущинский государственный университет и ² Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, SukhanovaTV@rambler.ru.

Дигидрохверцетин (ДГК) — антиоксидант флавоноидного ряда, обладающий Р-витаминной активностью, противоопухолевым, антимуtagenным, антиаллергическим и противовоспалительным действием. В связи с этим открываются перспективы широкого применения данного соединения в медицине и биотехнологии. Целью данной работы было исследование влияния ДГК на клеточную активность, состояние бислойных липидных мембран и коллагеновых фибрилл для определения концентраций, при которых возможно применение данного препарата в медицине. Для проведения исследований был использован ДГК производства ООО «Флавир» (Иркутск). Работа была проведена с использованием модельных систем — бислойных липидных мембран фосфатидилхолина, волокон коллагена типа I и фибробластов линии NCTC L929. Исследование адгезионной и пролиферативной активностей фибробластов линии L929 при культивировании их в среде ДМЕМ, содержащей 10^{-1} — 10^{-6} мг/мл ДГК и 0.5 % эмбриональной телячьей сыворотки (FBS HyClone), показало отсутствие токсичности у данного препарата и нелинейную зависимость влияния ДГК на пролиферативную активность клеток. В концентрации 0.1 мг/мл ДГК значительно снижает распластывание и пролиферативную активность клеток, что при культивировании более 2 сут приводит к клеточной гибели. В интервале концентраций ДГК 0.0001—0.0100 мг/мл отмечается пик, соответствующий 0.001 мг/мл, где отмечается стимуляция роста клеток. При концентрациях ДГК 10^{-5} мг/мл и ниже не наблюдается различий между опытом и контролем. При введении

в среду культивирования 5%-ной эмбриональной телячьей сыворотки при общем повышении уровня пролиферативной активности клеток сохраняются ингибирующее влияние ДГК на рост клеток в концентрации 0.1 мг/мл и стимулирующее — в концентрации 10^{-2} — 10^{-5} мг/мл. Таким образом, присутствие сыворотки оказывает стимулирующее влияние на рост клеток, но не блокирует воздействия на них ДГК. Исследования, проведенные с помощью искусственных бислойных липидных мембран, показали, что ДГК в концентрации 10^{-3} — 10^{-4} мг/мл стабилизирует липидный бислой (бислойные мембраны выдерживают высокие значения подаваемого напряжения — до ± 200 мВ). Возможно, именно стабилизация мембран является основным механизмом антимуtagenного и противоопухолевого воздействия ДГК. При увеличении концентрации ДГК до $3 \cdot 10^{-2}$ мг/мл проницаемость мембран увеличивается в 1000 раз по сравнению с контролем. Мы предполагаем, что стимулирующее влияние ДГК в концентрации 10^{-2} мг/мл и угнетающее влияние на распластывание и рост клеток в концентрации 10^{-1} мг/мл могут быть обусловлены его протонофорными свойствами. Возможно, именно мембранные механизмы лежат в основе нелинейной зависимости воздействия флавоноидов на клетки. Изучение влияния ДГК на состояние фибрилл коллагена типа I было проведено методом дифференциальной сканирующей микроскопии. Исследование показало дозозависимое возрастание температуры и увеличение кооперативности плавления волокон при инкубировании коллагена с ДГК. По истечении 2 мес инкубации с препаратом ДГК температура плавления волокон коллагена возрастает от 50.1 °C в контроле до 52.7 °C при 0.001 мг/мл ДГК и до 61.5 °C при 0.1 мг/мл ДГК. Основные изменения температуры плавления фибрилл и кооперативности фазового перехода происходят в течение 1-го мес инкубации. Это свидетельствует в пользу формирования дополнительных водородных связей, стабилизирующих структуру коллагеновых фибрилл. Таким образом, концентрация 0.001 мг/мл ДГК является оптимальной для использования препаратов ДГК в медицине и биотехнологии. При данной концентрации происходит стабилизация коллагеновых волокон и стимуляция пролиферативной активности клеток. Стимулирующее влияние ДГК в концентрации 10^{-2} мг/мл и угнетающее влияние на распластывание и рост клеток в концентрации 10^{-1} мг/мл могут быть обусловлены его протонофорными свойствами.

ВЛИЯНИЕ СВЕТА НА ТРАНСКРИПЦИЮ И МИТОТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ В ТКАНЯХ НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫСЯТ. © Е. Ю. Тавдшвили, П. В. Челидзе, Д. В. Дзидзигури. Факультет точных и естественных наук и Институт биологии Тбилисского государственного университета, Республика Грузия.

Биоритмология — активно развивающееся направление, изучающее ритмичность биологических процессов, проявляющихся на разных уровнях организации живой системы. Особенно важно исследование биоритмов на клеточном уровне, поскольку каждая клетка представляет собой самостоятельную функциональную единицу. Часто при изучении ритмичности клеточного и тканевого метаболизма одновременно используются методы *in vitro* и *in vivo*. Такой методологический подход принято считать наиболее информативным и достоверным.

Предпосылкой к настоящему исследованию послужили наши данные о циркадных ритмах гепатоцитов взрослых крыс и о ежесуточном (в течение 30 сут) изменениях транскрипционной активности в печени, селезенке и головном мозге новорожденных животных. Целью работы было изучение влияния светового фактора на ежесуточные изменения общего функционального состояния тканей белых крыс, отличающихся друг от друга по пролиферативным потенциалам, в течение 30 сут после рождения. Соответственно у незрячих и прозревших в нормальных условиях крысят (14—17-е сут постнатального развития) определяли: 1) митотический индекс в клеточной массе, диссоциированной из тканей печени, селезенки и головного мозга; 2) суммарную транскрипционную активность во фракциях ядер, выделенных из тех же тканей; 3) функциональное состояние клеток изученных тканей по ультраструктуре ядра и ядрышка. Для исключения влияния света на эти процессы отдельную группу животных содержали в темноте в течение 10 сут вплоть до их прозревания. Обнаружена четкая ежесуточная корреляция между ультраструктурой ядра/ядрышка и уровнем тотальной РНК-синтезирующей активности, определяемой в тест-системе изолированных ядер. При этом четко прослеживается ежесуточная зависимость ультраструктуры ядрышка от интенсивности транскрипции. Так, в гепатоцитах сроки появления наиболее активных (ретикулярных и компактных) ядрышек всегда совпадают с пиками синтеза РНК. В этой же ткани отмечается корреляция между ультраструктурой ядер/ядрышек и пролиферативной активностью гепатоцитов. Вместе с тем высоким показателем транскрипционной активности всегда соответствуют пики митотического индекса. При сравнении незрячих и прозревших крысят установлено, что световой фактор оказывает выраженное синхронизирующее влияние на транскрипционную и митотическую активность, поскольку у животных, прозревших в темноте, наблюдается асинхронизация этих процессов. Таким образом, установлено, что в синхронизации ежесуточных изменений транскрипционной и митотической активности решающая роль принадлежит световому фактору. Действительно, у незрячих и прозревших в темноте крысят транскрипция и митозы протекают асинхронно, тогда как после прозревания в обычных условиях эти процессы синхронизируются.

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫХ ПОВЕРХНОСТНЫХ АНТИГЕНОВ В ОПОСРЕДОВАНИИ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ СПЛЕНОЦИТОВ КРЫСЫ НА КУЛЬТИВИРУЕМЫЕ КЛЕТКИ ГЕПАТОМ. © Н. П. Терюкова, О. Н. Погодина, Г. И. Блиннова, В. А. Иванов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Формирование опухолевого фенотипа приводит к появлению в составе периферического аппарата клеток опухолеассоциированных антигенов, которые не только изменяют свойства клеток, но и оказывают определяющее влияние на взаимодействие трансформированных клеток с цитотоксическими клетками, в том числе и с естественными киллерами (ЕК). Например, экспрессия опухолеассоциированного антигена Rae-1 на поверхности клеток сублинии G-5 культивируемой мышинной гепатомы, обладающей высоким метастатическим потенциалом, примерно в 5 раз превышает содержание этого

антигена на клеточной поверхности сублинии G-1 с низким метастатическим потенциалом (Masuda et al., 2002). Вместе с тем клетки сублинии G-5 высокочувствительны к ЕК-опосредованному цитолизу при относительной устойчивости клеток G-1 к действию тех же эффекторов. Предобработка клеток G-5 поликлональными антителами к Rae-1 снижает их чувствительность к ЕК, что свидетельствует о непосредственном участии этого антигена в выполнении эффекторами своих функций иммунного надзора. Аналогично моноклональные антитела (МА) к эмбриональному антигену SSEA-1 ЕК-чувствительных клеток-мишеней ингибируют цитолитическое действие эффекторов (Harris et al., 1984). С другой стороны, экспрессия на поверхности клеток колоректальной карциномы раково-эмбрионального антигена (РЭА) определяет их устойчивость к ЕК-опосредованному лизису, а обработка клеток МА к РЭА значительно увеличивает чувствительность клеток-мишеней к действию эффекторов (Prado et al., 2002). Также предварительная обработка ЕК-чувствительных клеток МА к β -1 интегринам увеличивает не только конъюгацию между ЕК и клетками-мишенями, но и лизис последних (Rubio et al., 2002). Предположение об участии трансферриновых рецепторов клеток-мишеней во взаимодействии с ЕК не подтвердилось, поскольку МА к этому рецептору не блокировали литическое действие эффекторов (Dokhelar et al., 1984). Задача нашего исследования состоит в изучении поверхностных опухолеассоциированных антигенов клеток гепатоцеллюлярных опухолей крыс, в частности их роли во взаимодействии с ЕК — спленоцитами крысы. Определение цитолитической активности спленоцитов проводили морфометрическим методом, который ранее был использован для определения цитотоксической активности LAK-клеток на монослойных клеточных культурах (Geldhof et al., 2002). Принцип метода основан на том, что после инкубации с клетками-эффекторами погибающие опухолевые клетки открепляются от пластика, на котором были распластаны, и могут быть легко удалены промывкой лунок. Оставшиеся прикрепленные клетки фиксируют и окрашивают кумасси, после чего оценивают долю свободного от клеток пространства с помощью компьютерной программы анализа изображений. По нашим данным, доля гибели клеток гепатомы НТС в результате 4-часовой инкубации со спленоцитами крыс зависит от соотношения Е/Т и достигает примерно 84 % при соотношении 25 : 1, тогда как клетки гепатомы Зайдела более устойчивы к литическому действию спленоцитов и гибель клеток при соотношении 10 : 1 составляет в среднем 22 %, а при соотношении 2 : 1 — 28 %. Для изучения роли поверхностных опухолеассоциированных антигенов в опосредовании ЕК-лизиса нами получена иммуносыворотка против фракции, обогащенной плазматическими мембранами клеток гепатомы Зайдела, и тщательно истощена гомогенатом печени крыс. По данным иммуноблотинга, иммуносыворотка не реагирует с антигенами интактных гепатоцитов и направлена против опухолеассоциированных поверхностных антигенов с мол. массами порядка 54—57 и 250—270 кДа клеток гепатомы Зайдела и НТС, причем во фракции плазматических мембран клеток гепатомы Зайдела иммуносыворотка взаимодействует также с антигеном с мол. массой около 78—83 кДа. Судя по предварительным данным, предобработка клеток гепатомы Зайдела иммуносывороткой не изменяет чувствительности клеток к спленоцитам, тогда как лизис предобработанных иммуносыво-

роткой клеток гепатомы НТС достоверно повышается. Таким образом, мы показали следующее: 1) морфометрический метод анализа может использоваться для определения цитотоксического действия ЕК на монослойные культуры клеток; 2) клетки крысиных гепатом Зайдела и НТС являются клетками-мишенями для спленоцитов крысы, но обнаруживают различную чувствительность к литическому действию последних; 3) антигены с мол. массой порядка 54—57 и 250—270 кДа клеток гепатомы НТС могут быть вовлечены в процесс цитотоксического действия ЕК на опухолевые клетки. Полученные результаты позволяют предположить различные механизмы ЕК-опосредованной гибели клеток гепатом Зайдела и НТС.

Работа выполнена при финансовой поддержке С.-Петербургского научного центра РАН.

О РОЛИ РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ Alu-СЕМЕЙСТВА В НЕГАТИВНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА. © Н. М. Усманова, В. И. Казаков, Н. В. Томилин. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, nmusmanova@gmail.com.

Промоторы многих генов млекопитающих, кодирующих белки, содержат ретротранспозоны, которые могут участвовать в регуляции транскрипции этих генов РНК-полимеразой II. Ранее мы выяснили, что в некоторых промоторах генов человека ретротранспозоны Alu-семейства входят в состав цис-регуляторных модулей, содержащих сайт связывания для транскрипционного репрессора YY1, и перекрываются с метилированными островами CpG, роль которых в регуляции транскрипции хорошо установлена. В данной работе мы проверили транскрипционную активность ассоциированных с CpG-островами Alu-последовательностей в промоторах генов *DNaseII* и *CAMLG*. Фрагменты промоторов были субклонированы в плазмиду, содержащую репортерный ген люциферазы. Полученные конструкции вводили в клетки человека путем трансфекции. В экстрактах из этих клеток исследовали активность люциферазы. Показано, что Alu, локализованные в промоторах указанных генов, подавляют экспрессию гена люциферазы, т. е. содержат негативный элемент (глушитель) транскрипции. По-видимому, таким элементом является Alu-ассоциированный сайт связывания YY1, активность которого была продемонстрирована нами ранее. Негативный Alu-ассоциированный элемент в промоторе гена *CAMLG* может быть важен для подавления его экспрессии в некоторых тканях человека, например в клетках сердца, печени и почек, но этот элемент не работает, по-видимому, в нейронах головного мозга, где ген *CAMLG* экспрессируется на высоком уровне. Тканеспецифическая активность некоторых сайтов для YY1 обнаружена другими авторами на примере миозиновых генов мышей. Мы выяснили, что YY1-сайты (YBS) имеются примерно в 35 % всех Alu-повторов генома человека, их глобальное распределение в хромосоме 1 положительно коррелирует с распределением островов CpG и Alu-повторов, но отрицательно коррелирует с распределением повторов в L1. Таким образом, Alu-повторы вносят весьма существенный вклад в негативную регуляцию транскрипции в клетках человека, особенно важную для тканеспецифических генов.

ХАРАКТЕР ЭКСПРЕССИИ ЭЛЕМЕНТОВ L1 В СЕМЕННИКАХ И ПЕЧЕНИ КРЫСЫ. © А. В. Федоров, Д. В. Лукьянов, О. И. Подгорная. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, an_tn@mail.ru.

У млекопитающих наиболее распространенным семейством автономных мобильных элементов, содержащих способные к перемещению копии, являются семейства ретротранспозонов L1. Данные о функционировании элементов L1 и их возможной роли во многих клеточных процессах больше не позволяют рассматривать повторы L1 лишь как «паразитическую» ДНК в геномах. Элементы L1 влияют на геном главным образом посредством ретротранспозиции, требующей экспрессии РНК L1 и кодируемых ею белков. Неконтролируемая ретротранспозиция элементов L1 может приводить к катастрофическим последствиям дестабилизации генома и играть роль в малигнизации клеток. Несмотря на это, ретротранспозиция элементов LINE1 не является абсолютно запрещенной у млекопитающих и происходит в определенных типах клеток. Следовательно, существует четкий контроль как активации, так и репрессирования этих повторов *in vivo*, однако механизмы регуляции экспрессии ретротранспозонов L1 во многом остаются неизвестными. За транскрипцию L1 ответственны видоспецифичные промоторные последовательности, расположенные в 5'-нетранслируемых районах L1. В настоящей работе был определен характер экспрессии РНК L1 в клетках печени половозрелых крыс по сравнению с семенниками животных в возрасте 10—90 сут. Полноразмерные дискретные смысловые транскрипты элементов L1 крысы были обнаружены только на определенных стадиях развития семенников. В клетках печени был обнаружен лишь дисперсный набор смысловых и анти-смысловых транскриптов, которые, по всей видимости, не транслируются и поэтому не способны участвовать в ретротранспозиции L1. Дисперсные комплементарные транскрипты L1 в клетках печени возникают, по-видимому, за счет неспецифической транскрипции с соседних промоторов и, вероятно, могут участвовать в образовании длинной двухнитевой РНК. В этих экспериментах также были выявлены малые РНК, гомологичные элементам L1. С помощью рестрикционного анализа было установлено, что богатый динуклеотидами CpG промотор L1 крысы полностью метилирован в клетках печени и частично деметилирован в семенниках. Следует отметить, что выявленное частичное деметилирование промоторов L1 коррелирует с наличием дискретных смысловых транскриптов L1. На основании полученных результатов можно заключить, что тканеспецифическое метилирование совместно с широко распространенными транскрипционными факторами может играть роль в регуляции транскрипции элементов L1 крысы. Обсуждается возможная связь между наличием малых РНК L1 и метилированием промоторов L1.

Работа выполнена при финансовой поддержке С.-Петербургского научного центра РАН и президиума РАН по программе «Молекулярная и клеточная биология».

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ РИБОСОМНЫХ ГЕНОВ В ГИБРИДНЫХ КЛЕТКАХ, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ СЛИЯНИИ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ И СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК. © Е. И. Филясова, Ю. М. Ходарович,

О. А. Ларионов, О. В. Зацепина. Институт биоорганической химии РАН, Москва, fei@mail.ibch.ru.

В работе описаны оригинальные гибриды, полученные в результате слияния клеток мышинной эмбриональной карциномы PCC4aza1 и клеток селезенки взрослой мыши, активированных к пролиферации и обработанных деметилирующим агентом 5-азациитидином. Полученные гибридные клетки сохраняли морфологию родительских клеток тератокарциномы, экспрессировали ген *Oct-4*, являющийся маркером плюрипотентных клеток, и не экспрессировали гены *CD11* и *CD45*, специфичные для лимфоцитов. Кроме того, гибридные клетки были способны к направленной дифференцировке *in vitro* в кардиомиоциты под действием ДСМО. С целью изучения влияния среды культивирования на метаболизм гибридных клеток и связанную с ним активность рибосомных генов клетки культивировали в селективных или неселективных условиях. Селективные условия подразумевают присутствие в среде для культивирования ГАТ (10^{-4} М гипоксантин, $7 \cdot 10^{-7}$ М аминокперин и 10^{-5} М тимидин). Именно такую селекцию использовали непосредственно после процедуры слияния для отбора гибридных клонов. Наши данные показали, что в процессе культивирования гибридных клеток в неселективных условиях происходит потеря ядрышкообразующих (ЯО) хромосом, тогда как культивирование гибридных клеток в среде, содержащей ГАТ, способствует сохранению общего количества ЯО-хромосом. Однако при этом в селективных условиях в гибридных клетках наблюдалось уменьшение количества активных ядрышкообразующих районов (ЯОР) (Ag-ЯОР) по сравнению с количеством Ag-ЯОР в клетках, культивируемых в неселективных условиях. По данным проточной цитофлуориметрии, выращивание гибридов в селективных условиях приводит к увеличению продолжительности S-периода клеточного цикла и всего цикла в целом, что вызвано включением запасных путей биосинтеза пуриновых и пиримидиновых оснований, запускаемых добавлением в среду ГАТ. Следствием присутствия в среде для культивирования гибридных клеток ГАТ является снижение скорости пролиферации клеток. Таким образом, наши данные впервые показали, что снижение пролиферативной активности гибридных клеток сопровождается инактивацией транскрипции рибосомных генов (уменьшением числа активных ЯОР). Интересным также представляется тот факт, что при культивировании гибридов в неселективных условиях в первую очередь «теряются» ЯО-хромосомы. В целом эти наблюдения свидетельствуют в пользу того, что репрограммирование геномов родительских клеток включает изменения в состоянии (общем числе и активности) ЯОР хромосом.

Работа выполнена при финансовой поддержке РАН по программе «Стволовые клетки».

ДИНАМИКА ЭЛИМИНАЦИИ ФОСФОРИЛИРОВАННОГО ГИСТОНА γ -H2AX ИЗ ДНК В ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ МОЗГА И ПЕЧЕНИ ЗЛОТИСТОГО ХОМЯЧКА *IN SITU*. © Д. В. Фирсанов, Б. А. Гаврилов, В. М. Михайлов, Н. В. Томилин. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, alexdelfigo@mail.ru.

Двухнитевые разрывы (ДР) ДНК, которые могут быть вызваны действием ионизирующей радиации (ИР)

и химическими агентами, считаются наиболее опасными повреждениями генома и могут приводить к его нестабильности, клеточной гибели и у высших эукариотов — к развитию канцерогенеза. Было показано, что самой ранней реакцией клетки на образование ДР является фосфорилирование по 139-серину минорного корового гистона H2AX в мегабазных доменах хроматина около каждого разрыва с образованием γ -H2AX (Rogakou et al., 1998, 1999). Показано, что образование и элиминация γ -H2AX в различных клеточных культурах связаны с образованием и зашиванием ДР (Rogakou et al., 1999; Nazarov et al., 2003). Время половинной элиминации γ -H2AX в линиях опухолевых клеток и тканях коррелирует с их радиочувствительностью (Olive, Banath, 2004). Однако на сегодняшний день мало данных о динамике γ -H2AX в дифференцированных тканях млекопитающих, которые представляют собой важные аспекты действия радиации. Недавно мы показали, что в дифференцированных клетках сердца линейных мышей наблюдается замедленная элиминация γ -H2AX и что около 50 % γ -H2AX-положительных ядер от максимального значения наблюдается через 23 ч после рентгеновского облучения (Gavrilov et al., 2006). В этой работе с помощью иммуногистохимии мы исследовали динамику образования и элиминации γ -H2AX в клетках мозга и печени золотистых хомячков после рентгеновского облучения. Необлученные ткани мозга содержали около 2 %, а ткани печени около 5 % γ -H2AX-положительных ядер, в то время как в тканях, фиксированных через 1 ч после рентгеновского облучения в дозе 5 Гр, количество γ -H2AX-положительных ядер составило около 34 % в тканях мозга и около 25 % в тканях печени. Исследуя ткани хомячков через разные временные интервалы после рентгеновского облучения в дозе 5 Гр, мы выяснили, что элиминация γ -H2AX в клетках мозга идет медленно и через 6 ч после облучения наблюдается примерно 30 % γ -H2AX-положительных ядер. Через 24 ч после облучения число γ -H2AX-положительных ядер не достигает значения для необлученных тканей мозга и составляет около 7 % от общего числа ядер. В клетках же печени через 6 ч после облучения половина γ -H2AX-положительных ядер элиминируется, а через 1 сут их число полностью восстанавливается. Эти данные могут свидетельствовать о том, что в клетках мозга восстановление хроматина идет медленнее, чем в клетках печени. Наши недавние результаты (Gavrilov et al., 2006) и результаты, представленные в настоящей работе, свидетельствуют о том, что существуют большие вариации между непролиферирующими тканями млекопитающих в уровне фосфорилирования H2AX, а также в динамике элиминации γ -H2AX после рентгеновского облучения, что должно быть принято во внимание при анализе последствий радиации.

Работа выполнена при финансовой поддержке президиума РАН по программе «Фундаментальные науки — медицине» (грант 101-04-243).

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *Oct-4P1* И *Nanog* В ГЛАЗУ ЧЕЛОВЕКА. © Н. В. Фирсова,¹ Ю. В. Маркитантова,¹ Ю. А. Смирнова,¹ И. Г. Панова,¹ А. С. Микаелян,¹ Е. А. Воротеяк,¹ Р. А. Полтавцева,¹ Г. Т. Сухих,² Р. Д. Зиновьева,¹ В. И. Миташов.¹ ¹ Институт биологии развития РАН и ² ГУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии РАМН, Москва.

У взрослых млекопитающих, в том числе у человека, в лимбальной области роговицы, в пигментированной области цилиарных складок и в периферической сетчатке обнаружены клетки, по своим характеристикам полностью соответствующие стволовым. Единичные клетки дают клоны, дифференцирующиеся после длительного культивирования в биполярные нейроны, Мюллеровскую глию и фоторецепторы. Данная работа посвящена изучению экспрессии регуляторных генов, которые помогут идентифицировать и локализовать мультипотентные клетки в развивающемся и взрослом глазах человека, а также понять функциональную роль этих генов. Исследование проводили с использованием молекулярно-генетических, иммунохимических и морфологических методов. Материалом исследования служили препарированные ткани развивающегося и взрослого глаза человека, а также культивированные клетки эмбриональной сетчатки и клетки цилиарной области взрослого глаза. С помощью ПЦР впервые были идентифицированы транскрипты ЭС-специфических генов *Oct-4* и *Nanog* в тканях развивающегося глаза (роговице, хрусталике, сетчатке и оболочках глаза; 9.5 и 22.0 нед развития). ПЦР-фрагменты с праймерами, синтезированными по последовательностям *Oct-4* и *Nanog*, были получены также на мРНК из тканей взрослого глаза (периферической и центральной сетчатки, области глазного нерва, радужки, цилиарного тела и пигментного эпителия). Максимальный уровень экспрессии генов *Oct-4* и *Nanog* детектируется в клетках цилиарного тела и пигментного эпителия. Экспрессия исследуемых генов наблюдается и в культивированных клетках эмбриональной сетчатки и цилиарного тела взрослого глаза. ДНК соответствующих ПЦР-фрагментов были отсекуены. Нуклеотидная последовательность ПЦР-фрагмента, полученного с праймерами к гену *Oct-4*, проявляет 100%-ную гомологию с процессируемым псевдогеном *Oct-4P1*. Нуклеотидная последовательность ПЦР-фрагмента, полученного с праймерами к гену *Nanog*, проявляет с ним 100%-ную гомологию. Иммунопозитивная реакция на окрашивание антителами к *Oct-4* и *Nanog* показала не только наличие соответствующих белковых продуктов, но и различие паттерна экспрессии в тканях глаза 12 и 22 нед развития. Ядерная локализация экспрессии этих белков свидетельствует о принадлежности к классу транскрипционных факторов. Результаты иммунохимических исследований согласуются с данными ПЦР-анализа. В настоящее время функциональная роль идентифицированных нами транскрибируемого процессируемого псевдогена *Oct-4P1* и гена *Nanog* в клетках глаза неясна. Мы предполагаем, что эти гены могут иметь глазоспецифические регуляторные функции. Возможно, они участвуют в поддержании мультипотентного статуса и(или) способности к пролиферации клеток глаза.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проекты 05-04-48502 и 05-04-48026) и по программе президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

ПОСТРОЕНИЕ КОНТИГА ГЕНОМНЫХ КЛОНОВ КЛАСТЕРА КАЗЕИНОВЫХ ГЕНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА. © К. А. Фомичев,¹ Т. Малевски,² А. Л. Сазанова,¹ А. А. Сазанов.¹ ¹Всероссийский науч-

но-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных РАСХН, Санкт-Петербург—Пушкин, asazanov@vniigen.ru, и ² Институт генетики и разведения животных Польской академии наук, Ястржебец, 05-552 Вулка Косовска, Польша.

Нуклеотидные последовательности кластера казеиновых генов крупного рогатого скота (КРС) представляют интерес как с точки зрения возможности получения молекулярных маркеров для селекции КРС на повышение молочной продуктивности, так и для создания высокоэффективных векторов для трансгеноза. Получение протяженных ДНК-клонов необходимо для сравнительного анализа кодирующих и регуляторных нуклеотидных последовательностей этого кластера. В качестве ДНК-зондов для скрининга гридированной библиотеки КРС CHORI-240 Сегмент I (<http://bacpac.chori.org/bovine240.htm>) были использованы фрагменты последовательностей, содержащих 5'-фланкирующий район и экзон 1-го гена *CSN1S1* КРС (идентификационный номер X035.90), экзон 4-го и интрон 4-го гена *CSN3* КРС (идентификационный номер AJ841946). Амплификация при помощи ПЦР с использованием в качестве матрицы тотальной ДНК КРС черно-пестрой породы привела к получению фрагментов длиной 319 п. н. для гена *CSN1S1* и 270 п. н. для гена *CSN3*. Гибридизацию реплик проводили в соответствии с рекомендациями производителя. Результаты гибридизации анализировали прямым сканированием на приборе Molecular Imager FX-Scan (BioRad). Проверку клонов на предмет содержания нуклеотидных последовательностей кластера казеиновых генов КРС проводили при помощи ПЦР с использованием в качестве матрицы последовательности геномных клонов. Длина вставки в ВАС-клонах CH240-130F23 и CH240-035O12 определена путем рестрикции их нуклеотидных последовательностей с использованием рестриктазы NotI и электрофоретического разделения в агарозном геле. 6 и 11 ВАС-клонов были выявлены вследствие гибридизации фильтров с последовательностями генов *CSN1S1* и *CSN3* соответственно. Установлено, что клоны CH240-130F23 и CH240-035O12 содержат гены *CSN1S1*, *CSN1S2*, *CSN2*, *STATH* и *CSN3*. 5 клонов выявлены как позитивные при ПЦР-амплификации с использованием праймеров, специфичных для генов *CSN2*, *STATH*, *CSN1S2* и *CSN3*. Нами показано, что геномные клоны CH240-130F23 и CH240-035O12 содержат гены *CSN1S1*, *CSN1S2*, *CSN2*, *STATH* и *CSN3*. Из геномной базы данных КРС (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/cow>) известно, что расстояние между генами *CSN1S1* и *CSN3* у КРС равно примерно 250 т. п. н. Размер вставки ВАС-клонов в геномной библиотеке КРС CHORI-240 Сегмент I составляет в среднем 180 т. п. н. и варьирует от 100 до 270 т. п. н. (<http://bacpac.chori.org/bovine240.htm>). Проведенная нами рестрикция ДНК клонов CH240-130F23 и CH240-035O12 позволила установить размеры вставки — 263 и 265 т. п. н. соответственно. Таким образом, клоны CH240-130F23 и CH240-035O12 включают в себя все кодирующие последовательности кластера и около 15 т. п. н. 5'-фланкирующей области. Последовательности 5 ВАС-клонов содержат гены *CSN2*, *STATH*, *CSN1S2* и *CSN3*. Следовательно, полученный контиг содержит не только все известные гены казеинового кластера КРС, но и значительную часть 3'-фланкирующей области. По сведениям геномной базы данных КРС, гены *STATH* и *CSN1S2* расположены

в пределах контига NW_936323 в положениях 82—1090 п. н. и 26 595—38 541 п. н. соответственно, в то время как гены *CSN2* и *CSN1S1* находятся в положениях 418 544—426 774 и 445 522—463 059 п. н. контига NW_973412. Информация о локализации гена *CSN3* отсутствует (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Таким образом, расстояние между генами *STATH* и *CSN1S2* составляет 25 505 п. н., а между генами *CSN2* и *CSN1S1* — 18 748 п. н. На основании известного размера вставки в клонх библиотеки CHORI-240 и приблизительной оценки расстояния между генами *CSN1S1* и *CSN3* в 200 т. п. н. можно заключить, что полученный нами контиг содержит до 70 т. п. н. 3'-фланкирующей области.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-48031-а).

ХАРАКТЕР РЕОРГАНИЗАЦИИ РАДИАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ МИКРОТРУБОЧЕК В КЛЕТКАХ HeLa С РАЗЛИЧНОЙ ДИНАМИКОЙ ЭНДОЦИТОЗА РЕЦЕПТОРА. © М. В. Харченко, М. В. Злобина, Б. В. Шрамко, Е. С. Корнилова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Известно, что перемещение эндосом от периферии клетки в околядерную область происходит с участием микротрубочек (МТ). При этом считается, что в ходе везикулярного транспорта архитектура тубулинового цитоскелета остается стабильной. Однако исследуя эндцитоз ЭФР-рецепторных комплексов в клетках линии HeLa методом двойной непрямой иммунофлуоресценции, мы обнаружили, что в ходе этого процесса организация системы МТ претерпевает значительные изменения. В общем случае система МТ сохраняет радиальность вплоть до поздних этапов локализации ЭФР-рецепторных комплексов в ранних эндосомах. Процесс превращения ранних эндосом в поздние в ходе созревания эндосом сопровождается фрагментацией большинства длинных радиальных МТ и их деполимеризацией. Эндосомы на этом этапе концентрируются в околядерной области вокруг ЦОМТ. Протеолиз и лиганда, и рецептора происходит на стадии взаимодействия зрелых поздних эндосом с лизосомами. На этом этапе наблюдается восстановление радиально организованной системы МТ. Однако такая последовательность событий наблюдается не всегда. Ранее мы сообщали о том, что параметры эндцитоза ЭФР-рецепторных комплексов (скорости интернализации, рециклирования, сортировки в поздние эндосомы и лизосомной деградации) могут варьировать в широких пределах в клетках одной и той же линии в зависимости от внешнего контекста (сыворотки). Можно разделить клетки по эффективности доставки рецептора ЭФР в поздние эндосомы и лизосомы и по скорости деградации на клетки с «быстрым эндцитозом» и клетки с «медленным эндцитозом». В клетках с «быстрым эндцитозом» рецепторсодержащие эндосомы активно перераспределяются в околядерную область (15—30 мин после стимуляции эндцитоза), образуя там компактный кластер относительно крупных везикул. Этой стадии соответствует фрагментация околядерных МТ (30—60 мин). Затем происходит восстановление радиальных МТ. По времени это коррелирует с исчезновением рецептор-положительной окраски клеток

вследствие их деградации (90—150 мин). В случаях «медленного эндцитоза» перераспределение эндосом в околядерную область было значительно менее выраженным, а в некоторых экспериментах практически отсутствовало. В более чем 95 % экспериментов при такой динамике эндцитоза первоначально радиальные МТ незначительно фрагментировались, а затем полностью деполимеризовались и не восстанавливались за 150 мин эксперимента. Эндосомы при этом не увеличивались в размере, что указывает на подавление процесса их созревания. Эти результаты свидетельствуют о том, что вся последовательность реорганизаций системы МТ не запрограммирована изначально на ранней стадии эндцитоза. Представляется вероятным, что сигнал на фрагментацию/деполимеризацию МТ и сигнал на их восстановление генерируются на разных стадиях эндцитоза, различающихся по степени «зрелости» эндосом.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-49046).

ПОЗИЦИОННОЕ КЛОНИРОВАНИЕ QTL ДОМАШНЕЙ КУРИЦЫ И АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ. © Ю. А. Химанина,¹ В. А. Ескольникова,¹ Т. Малевски,² К. Яцак,² А. Л. Сазанова,¹ А. А. Сазанов.¹ ¹ ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных РАСХН, Санкт-Петербург—Пушкин, asazanov@vniigen.ru, и ² Институт генетики и разведения животных Польской академии наук, Ястржебец, Польша.

Нами проведен ряд экспериментов по позиционному клонированию двух районов хромосомы 4 домашней курицы, содержащих QTL толщины скорлупы, на 53-й нед жизни (ST53) и массы белка в яйце на 33-й нед (AW 33). Методом гибридологического анализа косегрегации микросателлитных ДНК-маркеров и количественных признаков определены маркеры интервалов генетической карты (районов хромосом), контролирующих QTL AW33 и ST53. С использованием баз данных сети Интернет показана локализация количественного признака AW33 в пределах интервала, ограниченного микросателлитными локусами MCW0170 и LEI0081, и QTL ST53 внутри района с границами MCW0114 и ADL0241. Установлено следующее положение микросателлитных маркеров локуса ST53 на GGA4: MCW0114 — 17 834 202—17 834 699 п. н. и ADL0241 — 16 643 314—16 643 645 п. н. Полученный интервал величиной 1.2 млн п. н. является критическим для признака ST53. Выявлено 18 EST (кодирующих последовательностей) домашней курицы, расположенных в этом районе, которые можно считать генами-позиционными кандидатами для этого QTL. В отношении QTL AW33 установлена локализация единственного достоверно известного микросателлитного маркера этого количественного признака — MCW0170 (MCW0191) на GGA4 в положении 68 451 521—68 451 718 п. н. Поскольку были известны направление, в котором расположен район, критический для QTL A33, и примерное рекомбинационное расстояние для доверительного интервала его локализации, вторая граница QTL определена в сайте локализации ортолога гена *CLOCK* (65 650 518—65 589 897 п. н.), кото-

рый на основании его функциональной характеристики был признан наиболее вероятным геном-кандидатом для AW33. Для выявления кодирующих последовательностей внутри контигов и их сравнения с известными генами других организмов использовали пакет компьютерных программ BLAST. Дизайн олигонуклеотидов-праймеров для РТ-ПЦР в режиме реального времени проводили на основании информации баз данных сети Интернет (www.nlm.ncbi.nih.gov и www.ensembl.org) при помощи компьютерной программы PRIMER_INPUT_3 (www-genome.wi.mit.edu). Проверку полученных последовательностей праймеров на предмет специфичности и отсутствия возможной внутригеномной гомологии проводили при помощи пакета программ «Электронный ПЦР» и BLAST с варьирующими параметрами величины окна, допустимого процента идентичности пар оснований и фильтрации повторов. По 5 птиц с высоким (STH) и низким (STL) значениями признака ST53 из пород RIR и G1P было использовано для приготовления матричной РНК и кДНК. Средние значения и стандартные отклонения признака ST53 в группах были следующими: RIR STH = 378.40 ± 3.65 мкм, RIR STL = 227.80 ± 8.99 , G1P STH = 372.40 ± 2.07 , G1P STL = 248.60 ± 16.62 мкм. Изоляция яйцеводов была проведена на 5-е сут после измерения при помощи микрометра толщины скорлупы трех последовательных яиц на 53-й нед жизни несушки. ПЦР-амплификация на матрице кДНК из тканей яйцевода позволила установить наличие экспрессии 12 из 20 возможных генов-кандидатов на уровне разрешения РТ-ПЦР в реальном времени (до 40 циклов на матрице 100 нг). Методом РТ-ПЦР в режиме реального времени проведен анализ экспрессии 12 генов-кандидатов. Проведено сравнение относительной экспрессии этих генов (по отношению к реферативному гену *GAPDH*) в группах RIR STH, RIR STL, G1P STH и G1P STL. Выявлены достоверное двукратное ($P < 0.01$) различие по уровню экспрессии последовательности CR523443 между группами G1P STH и G1P STL и достоверная на том же уровне значимости связь (коэффициент корреляции 0.85) уровня транскрипции этой последовательности с толщиной скорлупы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-48031-а).

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ И ВЫЖИВАЕМОСТЬ БЛАСТОЦИСТ МЫШИ IN VITRO ПОСЛЕ МИКРОИНЪЕКЦИЙ. © Е. А. Храмова, И. В. Капралова, Л. М. Межевикина. Институт биофизики клетки РАН, Пущино, hramelan@mail.ru.

В преимплантационном периоде развития млекопитающих ключевую роль играет стадия бластоцисты. На этой стадии происходит пространственное и функциональное разделение клеток зародыша на внутреннюю клеточную массу и трофобласт, между которыми формируется полость зародыша, заполненная жидкостью, — бластоцель. Одной из важных характеристик успешного развития бластоцист служит изменение объема бластоцели относительно общего объема зародыша. По размеру полости судят о том, на какой стадии находятся бластоциста — ранней, средней или поздней. Это важно для успешного проведения микроинъекции, в частности, эм-

бриональных стволовых клеток (ЭСК) с целью оценки их потенциала развития в составе целого зародыша. При этом важно знать, какое количество клеток и в каком объеме среды необходимо ввести в полость бластоцисты, чтобы не нарушить ее развитие. Мы использовали бластоцисты мышей F1 после скрещивания беспородных самок с самцами линии MNRI. Зародыши вымывали из рогов матки через 4.5 сут беременности. Для работы использовали поздние бластоцисты, у которых объем полости составлял более 80 % от общего объема зародыша. В каждую бластоцисту вводили путем микроинъекции (Eppendorf, TransferMan NK) от 0.012 до 0.066 нл модифицированной среды Виттена. Общий объем бластоцисты измеряли до и после микроинъекции с помощью программного обеспечения PhotoM и рассчитывали по формуле $V = \pi/8 d_{\max}^2 d_{\min}$, где d_{\max} и d_{\min} — максимальный и минимальный диаметры соответственно. Выживаемость бластоцист оценивали в течение 72 ч культивирования in vitro в зависимости от количества введенной жидкости в полость бластоцисты. Показателем выживаемости служила способность бластоцист выходить из *Z. pellucida* и расплываться на 4-луночной чашке Петри (Nunc). Полученные данные свидетельствуют о том, что поздние бластоцисты гибридных мышей F1 имеют объем 0.586 ± 0.038 нл. Изменение этого объема в пределах 2.2—7.6 % приводит к снижению выживаемости зародышей на 30 % по сравнению с интактными бластоцистами. При изменении объема бластоцист на 11.2 % их выживаемость снижается на 50 %. По расчетным данным, такие незначительные изменения объема поздних бластоцист соответствуют введению в бластоцель от 9 до 31 и 47 эмбриональных стволовых клеток мыши соответственно. Можно ожидать, что после микроинъекции большого количества клеток выживаемость бластоцист в системе in vitro будет снижаться в результате изменения объема и морфологии зародыша. Безусловно, это зависит еще и от стадии, на которой проводится микроинъекция (объема полости), размеров клеток и состава среды, а также технических возможностей микроманипулятора. Однако для проведения успешной микроинъекции и последующего развития бластоцист определяющим моментом является количество введенных клеток. Если речь идет об ЭСК мыши, их число на одну позднюю бластоцисту не должно превышать 9 клеток. В этом случае выживаемость бластоцист после микроинъекции не будет отличаться от контроля.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-49521).

ДИНАМИКА РЕПЛИКАЦИИ ДОМЕНОВ ГЕТЕРОХРОМАТИНА. © В. Чагин,^{1,2} В. Бушманн,¹ Х. Сакамото,¹ М. К. Кардозо.¹ ¹ Центр молекулярной медицины Макса Дельбрюка, Берлин, Германия, и ² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Репликация ДНК представляет собой сложный пространственно-временной процесс, при котором происходит снятие всех уровней упаковки хроматина. Масштаб деконденсации хроматина в процессе репликации до конца не изучен. Также многое неизвестно о распространении процесса репликации в различные участки хромосом и связи прогресса репликации и деконденсации. Су-

существующие экспериментальные данные могут быть интерпретированы в рамках двух парадигм. Первая предполагает сборку фабрик репликации на поверхности крупных доменов хроматина, деконденсацию хроматина и транслокацию реплицирующейся ДНК из внутренних частей домена к репликативному комплексу и обратно с последующей конденсацией (Jaunin et al. *Exp. Cell Res.*, 2000, **260**: 313—323; Quivy et al. *EMBO J.*, 2004, **23**: 3516—3526). Вторая парадигма предполагает сборку репликативного аппарата в первоначальных сайтах репликации с последующим распространением «волны» репликации с преимущественной сборкой фабрик репликации в соседних областях хроматина с локальной деконденсацией реплицирующихся участков (Sporbert et al. *Mol. Cell.*, 2002, **10**: 1355—1365). Для исследования динамической организации процесса репликации в клетках млекопитающих мы использовали многомерную сканирующую конфокальную микроскопию живых клеток мыши. Для анализа расположения аппарата репликации, визуализированного с помощью GFP-PCNA относительно доменов хроматина *in vivo*, домены мини- и макросателлитов были визуализированы с помощью CENPB-DsRed и MECP2-YFP соответственно. Наши данные указывают на то, что репликация доменов гетерохроматина в клетках млекопитающих происходит посредством последовательной локальной деконденсации хроматина и проникновения аппарата репликации внутрь макродоменов. Процесс репликации периферического хроматина мыши носит направленный характер, при этом участки минисателлитов индивидуальных хромосом реплицируются после макросателлитных повторов.

МОДУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ СТАНДАРТНЫХ АМИНОКИСЛОТ НА РАЗВИТИЕ КУЛЬТУРЫ ТКАНЕЙ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА. © Н. И. Чалисова,¹ А. Н. Закуцкий,¹ А. И. Анискина.² ¹ Институт физиологии РАН, Санкт-Петербург, и ² С.-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН.

Регуляция репаративных процессов в тканях организма (за счет стимуляции клеточной пролиферации или ее торможения при процессах апоптоза) осуществляется при действии различных цитокинов. В последнее время накапливаются данные о влиянии аминокислот на клеточный цикл. Однако систематического исследования этой проблемы до сих пор не проводилось. Целью настоящей работы было исследование влияния 20 стандартных L-аминокислот на развитие эксплантатов селезенки, печени, коры головного мозга (тканей мезо-, энто- и эктодермального генеза) 1-суточных (незрелые ткани) и 21-суточных (зрелые ткани) крыс. Адекватным методом для быстрой оценки направленности влияния исследуемых биологических активных веществ является органоטיפическое культивирование. Изменение количества клеток в опыте по сравнению с контролем может служить первичной оценкой биологической активности исследуемого вещества и быть основанием для поиска эффектов на организменном уровне. Отпрепарированные в стерильных условиях фрагменты тканей помещали в чашки Петри с коллагеновым покрытием. Питательная среда состояла из 35 % среды Игла, 35 % раствора Хенкса и 25 % фетальной телячьей сыворотки. Каждую из исследуемых L-аминокислот (Sigma, США) добавляли в экспериментальные чашки в эффективной концентрации

10⁻¹¹—10⁻¹² М. Индекс площади (ИП) эксплантата рассчитывали как отношение площади всего эксплантата к площади его центральной зоны. Проапоптозный белок p53 выявляли иммуногистохимически с использованием моноклональных антител к этому белку (1 : 75, Novocastra). Выявлено, что аминокислоты с заряженной боковой группой и низкой гидрофобностью — аспарагин, лизин, аргинин и глютаминовая кислота — оказывали ингибирующее влияние на зону роста эксплантатов незрелой ткани всех трех типов, взятой от 1-суточных животных (ИП снижался на 22—38 %), и, наоборот, стимулирующее влияние на зрелую ткань селезенки и печени крыс (ИП увеличивался на 28—42 %). Такого «зеркального» эффекта не было у других аминокислот, большинство из которых ингибировали клеточный рост как в незрелых, так и в зрелых тканях. На эксплантаты коры головного мозга 21-суточных крыс стимулирующее влияние оказывала другая группа аминокислот — высокогидрофобных (валин, треонин, лейцин, изолейцин, тирозин, фенилаланин и триптофан), при действии аминокислот с заряженной боковой группой ИП оставался на уровне контроля, остальные аминокислоты вызывали снижение ИП в ткани мозга. Установлена отрицательная корреляция между ИП и площадью экспрессии белка p53. Во всех случаях угнетения пролиферации под действием аминокислот экспрессия белка p53 увеличивалась на 35—48 %, а в случаях увеличения ИП снижалась на 25—35 %. Можно заключить, что 4 из 20 стандартных аминокислот — с заряженной боковой цепью и часто встречающиеся в повторяющихся блоках регуляторных белков (аспарагин, лизин, аргинин и глютаминовая кислота) — обладают способностью разнонаправленно регулировать клеточные процессы в мезо- и энтодермальных тканях в различные периоды онтогенеза. Известно, что запрограммированная клеточная гибель особенно сильно проявляется на ранних стадиях онтогенеза, когда преобладают популяции клеток, находящихся на начальной стадии дифференцировки и восприимчивых к факторам, индуцирующим отрицательную селекцию клеток. Аминокислоты с заряженными боковыми группами оказывают ингибирующее влияние на развитие эксплантатов незрелой ткани селезенки и печени, так как в данный период эти аминокислоты выступают как индукторы апоптоза. Обнаруженные модулирующие свойства аминокислот могут быть учтены при целенаправленном синтезе новых биорегуляторных пептидов, включающих в себя эти аминокислоты. Возможно, вместо коротких пептидов, синтез которых дорогостоящ, можно будет использовать влияние отдельных аминокислот на различные ткани. Усиление процессов апоптоза в незрелой ткани под влиянием ряда аминокислот открывает перспективы возможного их использования при лечении злокачественных опухолей, состоящих из недифференцированных клеток.

ОСОБЕННОСТИ ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО РОСТА ГЕПАТОПАНКРЕАСА *Helix lucorum*. © Н. Г. Чиладзе,¹ И. Р. Модебадзе,¹ Т. Д. Мchedлидзе,¹ Б. Н. Кудрявцев,² Д. В. Дзидзигури.¹ ¹ Тбилисский государственный университет, Республика Грузия, ldb@access.sanet.ge, и ² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Изучены особенности восстановительного роста гепатопанкреаса моллюска — аналог печени позвоноч-

ных — наземного брюхоногого моллюска *Helix lucorum*. Показано, что, подобно тому как это наблюдается в печени грызунов, в клетках гепатопанкреаса *H. lucorum* на ранних стадиях восстановительного роста после его частичной резекции (1/10 часть органа) происходит активация процессов транскрипции. Пролиферативную активность клеток гепатопанкреаса изучали в тот период года (до наступления гибернации), когда митотический индекс (МИ) клеток минимален (0.4 ‰). Наиболее высокие значения митотической активности в печени взрослых интактных улиток достигала весной (МИ 2 ‰), в активный период жизнедеятельности организма. Установлено, что частичная резекция органа стимулирует митотическую активность клеток (МИ 1.4 ‰) в печеночной ткани улитки, причем первый пик митотической активности в гепатопанкреасе наблюдается через 24 ч после резекции органа. В дальнейшем максимумы митотической активности клеток гепатопанкреаса обнаруживаются через 33, 42 и 144 ч после операции. Для того чтобы ответить на вопрос о том, достаточен ли данный уровень митотической активности клеток для восстановления утраченной массы, а также определить время, в течение которого достигается полное восстановление органа, измеряли сухую и влажную массу органа через 1 нед после операции. Установлено, что основная часть утраченной массы гепатопанкреаса *H. lucorum* восстанавливается через 1 нед после резекции. Полученные результаты позволяют заключить, что ткань гепатопанкреаса *H. lucorum* подобно ткани млекопитающих обладает высокой способностью к репаративной регенерации. Показано также, что соотношение трех основных типов клеток (пищеварительных, кальциевых и экскреторных), равное в долях интактного гепатопанкреаса *H. lucorum* 8 : 1 : 1, во время репаративной регенерации органа не изменяется.

НЕОБЫЧНЫЕ ОСМИОФИЛЬНЫЕ СТРУКТУРЫ В ЯДРЕ ГРАНУЛЯРНЫХ КЛЕТОК ПРЕДСЕРДИЯ БРЮХОНОГОГО МОЛЛЮСКА *Achatina fulica*. © С. В. Шабельников, О. А. Быстрова, М. Г. Мартынова, В. Н. Парфенов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

В предсердии брюхоногих моллюсков расположены крупные гранулярные клетки (ГК), морфологически тесно связанные с нервными окончаниями. Объединение ГК и нервных окончаний в стабильные нейроэндокринные комплексы позволяет предположить существование нервного контроля над функцией ГК. Методом электронной микроскопии мы исследовали состояние ГК после электрической стимуляции кардиорегуляторных входов и после множественных инъекций агониста β -адренорецепторов изопротеренола. Изопротеренол вводили в течение 3.5 мес в дозе 10 мкг на 1 г массы улитки. Всего было сделано 44 инъекции. Было показано, что стимуляция сердечного нерва вызывает массовую дегрануляцию ГК. Многие ГК полностью теряют гранулы и превращаются в небольшие агранулярные клетки с ядром, окруженным тонким ободком цитоплазмы. Под действием изопротеренола ГК значительно увеличивались в размере, при этом, судя по состоянию клеточной оболочки, процесс экзоцитоза гранул был существенно заблокирован. В обеих сериях экспериментов наблюдали появление в ядре ГК большого количества округлых осмиофильных структур диаметром в среднем 265 ± 70 нм двух видов — гомогенно окрашенных и с электрон-

но-прозрачной сердцевиной. Эти структуры располагались в эухроматине и ядрышках, тогда как в гетерохроматине они отсутствовали. Осмиофильные структуры не появлялись в ядрах ГК после одноразовых инъекций изопротеренола разной концентрации (10, 100 и 500 мкг на 1 г массы улитки). В ядрах других клеток предсердия, таких как кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, интерстициальные клетки и гемоциты, подобных структур не было обнаружено. Нам не удалось найти в литературе описание подобных образований. Мы полагаем, что появление осмиофильных структур связано с функциональными и морфологическими перестройками ядерного аппарата высокорепликативных ГК под воздействием специфических нервных медиаторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 05-04-49393) и в виде гранта президента РФ (НШ-1125.2006.4).

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ЯДЕРНОЙ ОБОЛОЧКИ ПРИ ГИПЕРЭКСПРЕССИИ ЛАМИНА В1. © Е. В. Шеваль, Е. Г. Волкова, С. А. Гольшев, С. Ю. Курчашова, В. Ю. Поляков. Научно-исследовательский институт физико-химической биологии Московского государственного университета, sheval_e@genebee.msu.su.

Экспериментальные и теоретические работы последних лет позволили на новом уровне подойти к пониманию процессов формирования клеточных структур. По современным данным, в обобщенной форме представленным в концепции самоорганизации (Misteli, 2001), стабильные структуры могут формироваться из высокодинамичных компонентов, что позволяет рассматривать процесс формирования ядерных структур как результат обратимой химической реакции. Малоизученными остаются ситуации, когда один из компонентов, формирующих структуру, присутствует в избыточном количестве, что должно приводить к сдвигу существующего равновесия. В настоящей работе проанализированы последствия гиперэкспрессии ламина В1, который является основным структурным белком ядерной оболочки — своеобразного внешнего скелета ядра. Для увеличения внутриклеточной концентрации ламина В1 клетки культуры HeLa трансфицировали плазмидой, кодирующей EGFP-ламина В1, уровень экспрессии ламина В1 определяли по яркости свечения экзогенного ламина. Показано, что повышенная экспрессия ламина В1 приводит к увеличению общей площади ядерной оболочки в ядре и формированию многочисленных ядерных инвагинаций. Таким образом, гиперэкспрессия одного из структурных компонентов может приводить к активизации процесса формирования всей структуры. При этом число ядерных пор (другого важного элемента ядерной оболочки), по-видимому, существенно не изменяется, так как плотность расположения индивидуальных поровых комплексов становится меньше. Можно полагать, что инвагинации ядерной оболочки, наблюдаемые изредка и в контрольных клетках, представляют собой результат вынужденной упаковки «избытка» ядерной оболочки. Обращает на себя внимание также то, что в ядрах клеток с гиперэкспрессией ламина В1 формируются крупные блоки конденсированного хроматина, которые никогда не выявляются в клетках с низким уровнем экспрессии.

Это косвенно свидетельствует о том, что избыток ядерной оболочки ведет к частичной инактивации генов. Клетки с самым высоким уровнем экспрессии ламина В1, выявляемые в культуре, имеют чрезвычайно большое число инвагинаций, что приводит к формированию структур, отдаленно напоминающих луковицу на разрезе. Однако детальный анализ ультраструктурной организации таких клеток показал, что большая часть этих клеток находится в процессе апоптотической гибели. Часть ламинсодержащих мембранных структур не располагается в контакте с ядрами и не содержит ядерных пор. На ультраструктурном уровне эти образования имеют вид протяженных стопок мембран, окаймляющих небольшие участки цитоплазмы. Анализ динамики EGFP-ламина В1, выполненный методом FRAP, показал, что вне зависимости от уровня экспрессии и его локализации этот белок обладает крайне низкой подвижностью, подобно тому как это наблюдается в нормальных ядрах. Таким образом, в работе описан феномен формирования избыточного количества ядерной оболочки в результате экспериментальной гиперэкспрессии ламина В1. Избыток оболочки образует многочисленные инвагинации, которые служат в качестве своеобразных хранилищ избытка сформировавшейся структуры, что может являться и механизмом нефункционального формирования инвагинаций в нормальном ядре.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 06-04-49560) и в виде гранта президента РФ для поддержки молодых исследователей (грант МК-7080.2006.4).

ПЕРИФЕРИЧЕСКИЙ ДОМЕН ХРОСОМОМНОГО СКЭФФОЛДА — НОВЫЙ ПАРАДОКС КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ. © *Е. В. Шеваль, В. Ю. Поляков.* Научно-исследовательский институт физико-химической биологии Московского государственного университета, sheval_e@genebee.msu.su.

В соответствии с постулатами радиально-петельной модели важную роль в формировании и организации митотической хромосомы играет специализированная белковая структура, выявляемая после солевой экстракции (2 М NaCl), — хромосомный скэффолд. По общепринятым представлениям, хромосомный скэффолд локализуется в осевых районах метафазных хроматид, а его устойчивость к солевой экстракции является доказательством структурной роли белков, входящих в его состав. В то же время показано, что во фракции изолированных скэффолдов выявляются белки, которые по цитологическим данным входят в состав периферических районов хромосом (Gassmann et al., 2005), так называемые белки периферического хромосомного слоя. Для разрешения такой парадоксальной ситуации в работе приведены результаты ультраструктурного и иммуноцитохимического анализа нативных и экстрагированных хромосом с использованием антител к одному из основных белков хромосомного скэффолда (топоизомераза Pa) и одного из белков периферического хромосомного слоя (pKi 67). Представлены экспериментальные доказательства того, что скэффолд образуется двумя структурными компонентами — периферическим и аксиальным. Аксиальный домен хромосомного скэффолда соответствует скэффолду

радиально-петельной модели, в то время как периферический домен, по-видимому, является остаточным компонентом периферического хромосомного слоя и не принимает участия в поддержании структурной целостности митотических хромосом. Поскольку существование периферического домена прямо противоречит основным постулатам радиально-петельной модели, рассматривается новый понятийно-логический аппарат для анализа белковых фракций и структур, выявляемых с помощью солевой экстракции.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 06-04-49560) и в виде гранта президента РФ для поддержки молодых исследователей (грант МК-7080.2006.4).

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИНКИНАЗ И ПРОТЕИНФОСФАТАЗ НА ПРОХОЖДЕНИЕ МИТОЗА В СИНХРОНИЗИРОВАННОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ТАБАКА ВУ-2. © *Я. А. Шеремет,¹ А. И. Емец,¹ Ж.-П. Вербелен,² Я. Б. Блюм.¹* ¹ Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, и ² Университет г. Антверпена, Бельгия.

Микротрубочки (МТ), являясь одним из ключевых компонентов цитоскелета, образуют в растительной клетке четыре основных типа построений: интерфазную сеть кортикальных МТ, препрофазную ленту, митотическое веретено и фрагмопласт. Ранее нами было показано, что растительный тубулин, так же как и тубулин животного происхождения, может подвергаться посттрансляционным модификациям, в том числе и фосфорилированию как по остаткам серина/треонина, так и по остаткам тирозина (Blume et al. Cell Biol. Int., 1997, 21: 918—920). Поскольку уровень фосфорилирования белков регулируется соотношением активности протеинкиназ и протеинфосфатаз, впоследствии мы исследовали влияние ингибирования процессов фосфорилирования/дефосфорилирования на организацию МТ в клетках растений. В ходе этих экспериментов было установлено, что ингибиторы протеинкиназ и протеинфосфатаз могут эффективно изменять структурные особенности как кортикальных, так и митотических МТ. Поэтому для выяснения взаимосвязи между эффектами ингибиторов протеинкиназ и протеинфосфатаз на структуру МТ растений и прохождением клеточного цикла нами было исследовано их влияние на прохождение растительными клетками митоза в суспензионной культуре клеток ВУ-2. Культура клеток ВУ-2 была синхронизирована с помощью афидиколина в ранней S-фазе, а спустя 4 ч после отмывки от афидиколина (в начале G₂/M-перехода) клетки обрабатывали ингибиторами. В качестве ингибиторов протеинфосфатаз были использованы ооадаичная кислота (ОА — ингибитор серин/треонин-протеинфосфатаз PP1 и PP2A) и ортованадат натрия (ОН — ингибитор тирозинфосфатаз). В качестве ингибиторов серин/треонин-протеинкиназ были использованы: ингибитор Ca²⁺-кальмодулинзависимой протеинкиназы W7, ингибиторы Ca²⁺-зависимой, фосфолипидстимулируемой протеинкиназы (протеинкиназы С) стауриспорин и Н7, а также ингибитор циклинзависимых протеинкиназ оломоуцин. В качестве ингибиторов тирозинкиназ использовали гербимицин А (ингибитор рецепторной тирозинкиназы) и генестеин (ингибитор

рецепторной протеинкиназы). Нами было установлено, что все тестируемые типы ингибиторов протеинкиназ и протеинфосфатаз вызывали значительные изменения в прохождении клеточного цикла и уровне митотического индекса (МИ) в сравнении с необработанной (контрольной) культурой, пик МИ которой наблюдался через 7 ч после отмывки от афидиколина. Показано, что в результате обработки культуры клеток ингибиторами протеинфосфатаз ОА (10 нМ) и ОН (250 мкМ) пик МИ был в 1.3 и 1.7 раза соответственно ниже, чем в контроле, что можно объяснить значительным снижением количества клеток, вступивших в профазу. Следует отметить, что в целом драматических изменений во времени вступления клеток в митоз и выхода из него при сравнении с контролем не было отмечено. Однако после обработки синхронизированной культуры клеток ингибиторами протеинкиназ наблюдались более значимые нарушения в прохождении митоза. Для двух ингибиторов — Н7 (50 мкМ) и оломоуцина (100 мкМ) — пик МИ был снижен почти в 3 раза, клетки вступали в митоз со значительным опозданием. После обработки культуры W7 (10 мкМ) и стауропорином (50 нМ) пик МИ был смещен на 1 ч позже и был снижен по сравнению с контролем в 1.5 и 1.7 раза соответственно. В результате обработки ингибиторами тирозинкиназ гербимицином А (30 мкМ) и генестеином (10 мкМ) пик МИ в обоих случаях был уменьшен в 1.7 раза, также было обнаружено запаздывание вступления клеток в митоз на 1 ч по сравнению с контролем. Таким образом, в результате проведенных экспериментов было показано, что ингибирование процесса фосфорилирования приводит к запаздыванию времени вступления клеток в митоз и к дальнейшим нарушениям их прохождения по фазам митоза, что может быть результатом нарушения динамики МТ вследствие замедления процесса тредмилинга МТ. В то же время активирование процесса фосфорилирования белков не вызывает драматических изменений в прохождении синхронизированных клеток по митозу.

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ЦИТОСКЕЛЕТА И ФОКАЛЬНЫХ КОНТАКТОВ ФИБРОБЛАСТАМИ НОРМАЛЬНОЙ, РУБЦОВОЙ И ЭМБРИОНАЛЬНОЙ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА НА БЕЛКАХ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА. © Н. М. Юдищева, М. И. Блинова, Г. П. Пинаев. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Изучение молекулярных механизмов морфогенеза — одна из основных проблем биологии ближайшего будущего. Одним из наиболее перспективных подходов к решению этой проблемы является исследование изменений цитоскелета. Элементы внеклеточного матрикса взаимодействуют с поверхностными рецепторами и регулируют различные клеточные процессы. Образование лиганд-рецепторных комплексов активизирует организацию цитоскелета клетки. В качестве модели, позволяющей изучить реакцию клетки на отдельные белки внеклеточного матрикса, предложена модель прикрепления и распластывания клетки на определенном лиганде. С помощью такого подхода представляется возможным установить зависимость организации актинового цитоскелета и формирования фокальных контактов от воздействия на клетку различных лигандов. В работе были проанализированы особенности формирования цитоскелета и фокальных контактов фибробластами из нормальной, руб-

цовой и эмбриональной кожи человека, культивируемые на субстратах: коллагене I и IV типов, фибронектине и ламинине 2/4. По полученным нами данным, фибробласты нормальной кожи человека в течение 60 мин адгезируют предпочтительно на коллагене I типа и фибронектине по сравнению с ламинином 2/4 и коллагеном IV типа. Для фибробластов рубцовой кожи наиболее предпочтительным оказались фибронектин и ламинин 2/4. Эмбриональные фибробласты кожи одинаково хорошо адгезируют на все выбранные белки внеклеточного матрикса. Таким образом, можно заключить, что характерные особенности организации системы микрофиламентов фибробластов, распластанных на различных лигандах, зависят от происхождения клеток и являются следствием специфичности конкретного лиганд-рецепторного взаимодействия.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки «Лот № 2005-ЖС-13.1/001» и в виде гранта президента РФ по поддержке ведущих научных школ, 2006—2007 (НШ-1244.2003.4).

ФАЗОВЫЕ ПЕРЕХОДЫ БЕЛКА В МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ (ВЫСЫХАЮЩАЯ КАПЛЯ) И ИХ ВОЗМОЖНОЕ БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ. © Т. А. Яхно, А. Г. Санин, О. Б. Шапошникова. Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород.

Переходы золь—гель являются неотъемлемым условием существования живых систем. Повышение вязкости протоплазмы, часто приводящее к ее желатинизации, является стереотипным результатом повреждающего действия на клетку физических и химических агентов (Насонов, Александров, 1940). Эта реакция наблюдается также и при денатурации нативных белков *in vitro*. Желатинизация белка может быть обратимой, поскольку обусловлена преобразованием вторичных, а не ковалентных связей (Александров, 1985). В частности, Браун и Моженко (1987) показали, что изменение вязкости и желатинизация цитоплазмы является результатом перехода актина из одной формы в другую (G-актин → F-актин). Высказана гипотеза (Pollar, 2001), согласно которой фазовые переходы белков цитоплазмы, контролируемые ионным составом, лежат в основе реализации практически всех функций живой клетки. Количество работ, посвященных изучению механизмов фазовых переходов белка, с годами не уменьшается, а растет, что говорит о важности данной проблемы. Интересной моделью, позволяющей изучать фазовые переходы белоксодержащих систем, является высыхающая капля. Исследуя процессы в каплях белково-солевых растворов, высыхающих на твердой подложке, мы наблюдали каскад фазовых переходов белка (от мицеллообразования до геля). Использовали методы оптической и атомно-силовой микроскопии, а также акустической импедансометрии. Объектом исследования служили 7%-ные (в) растворы BSA в 0.9%-ных (в) водных растворах NaCl, KCl, CaCl₂ или MgCl₂ без использования буфера. Капли объемом 3 мкл высыхали при комнатных условиях (20—25 °С, Н = 60—70 %) на предметных стеклах и на поверхности сенсорного устройства, регистрировавшего динамику акустомеханического импеданса. Высыхание капли начинается с образования твердотельного белкового валика по периферии. По мере испарения воды кон-

центрация соли в жидкой части капли повышается быстрее, чем концентрация белка, так как до 70 % белка, содержащегося в капле, расходуется на построение белкового валика. По достижении критического соотношения между белком, оставшимся в растворе, и солью в жидкой части капли начинается мицеллообразование. Дальнейшее повышение концентрации соли стимулирует слияние мицелл, образование кластеров, их седиментацию на подложку и желатинизацию осадка. Процесс фазовых переходов белка распространяется от периферии к центру капли. Последним этапом является кристаллизация соли в высыхающем геле центральной зоны. Наблюдаемые превращения белка полностью обратимы и хорошо воспроизводимы при добавлении новых порций воды. Процессы в капле и механические свойства высыхающей белковой пленки существенно зависят как от концентрации белка и соли в исходном растворе, так и от типа катионов (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} и Mg^{2+}). Замена BSA в солевом растворе другими белками приводит к изменению морфологической картины и динамики процесса. Последовательность событий в высыхающей капле остается неизменной. Полученные результаты позволяют предположить, что изменение концентрации и типа катионов в цитозоле влечет за собой изменение фазового состояния белков и механических характеристик клетки, что служит звеном в механизме регуляции ее физиологических функций.

DEVELOPMENT OF SEROTONERGIC NEURONS *IN VIVO* AND *IN VITRO* FROM EMBRYONIC STEM CELLS. © N. Alenina,^{1,2} D. Kikic,¹ M. Bader.¹ ¹ Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine, Berlin—Buch, Germany, and ² Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia.

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is a peripheral hormone produced mainly by enterochromaffin cells in the intestine and is released by platelets upon activation with essential functions in hemostasis, vasoconstriction and control of immune responses. Moreover serotonin has been thought to act as a morphogen in early stages of development, affecting craniofacial, cardiovascular and gastrointestinal morphogenesis. At the same time serotonin is a potent neurotransmitter synthesized in the raphe nuclei of the brain stem with multiple functions in the central and peripheral nervous system, being involved in the central control of food intake, sleep, mood, pain perception and sexual behavior. Accordingly, dysfunction of the serotonergic system has been implicated in the pathogenesis of neurological diseases, such as bipolar disorder and depression, therefore tools to generate or maintain 5-HT neurons *in vitro* may be of therapeutic value. Such tools can be assessed in embryonic stem (ES) cells, which can be differentiated *in vitro* to produce serotonergic neurons. In the meantime, differentiation methods were also developed and optimized for human and primate ES cells. Therefore, ES cells represent an excellent model for the discovery of new genes and factors involved in the differentiation of certain cell types, as well as for cell-based transplantation therapy. We established an effective differentiation protocol for ES cells which allow the generation of up to 50 % serotonergic neurons in all neurons developed. The method comprises first formation of embryoid bodies in non-adherent plastic dishes under serum-free conditions, followed by dissociation and replating of cells on poly-D-lysine/laminin 8 days after EB formation was initiated. After replating neu-

ronal precursor cells are first enriched for 2 days in a defined N2B27 medium by the addition of FGF2, and then terminal differentiation of neurons is completed after withdrawal of this growth factor. Specific expression of the serotonergic markers, *Pet1* and *Tph2*, as well as of transcription factors involved in the 5-HT specification *in vivo*, such as *Mash1*, *Nkx2.2*, *Gata3*, *Gata2*, and *Lmx1b* was monitored by RT-PCR in course of *in vitro* differentiation. Using this protocol we have shown that retinoic acid, which is known to induce neuronal differentiation in general, leads to a decrease in the number of serotonergic neurons probably by inhibiting expression of SHH, FGF4 and FGF8 — main players in early 5-HT specification *in vivo*. Accordingly, combined treatment with SHH and FGF4 increases several fold the percentage of 5-HT neurons (verified by immunostaining with anti-serotonin antibodies and the panneuronal marker Tuj1). To better understand the nature of serotonergic differentiation *in vivo* we generated mice lacking *Tph2*, a rate limiting enzyme in serotonin synthesis, which is expressed exclusively in the nervous system. Thus, we generated an animal model depleted in serotonin production in the brain and we confirmed complete absence of this neurotransmitter in raphe nuclei of knockout mice by HPLC and staining with anti-serotonin antibodies. Although mice knockout for *Tph2* can be born, they show development abnormalities, increased mortality and an up to 50 % reduction in body weight in the first weeks of life. *Tph2* knockout mice will allow to analyze the functional importance of the serotonin system in the brain and can be used to evaluate the functional capacities of serotonergic neurons developed from ES cells *in vitro*.

NEURONAL CALCIUM SIGNALING AND STRIATAL NEURODEGENERATION IN HUNTINGTON'S DISEASE. © I. Bezprozvanny. Department of Physiology, University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, Dallas, Texas 75390, USA.

Huntington's disease (HD) is a neurodegenerative disorder caused by polyglutamine (polyQ) expansion in Huntingtin protein (Htt). PolyQ expansion in Htt^{exp} causes selective degeneration of striatal medium spiny neurons (MSN) in HD patients. A central question in the study of HD is how this polyQ-expansion of Htt leads to the neurodegeneration of MSN. Recently we discovered that mutant Htt^{exp} selectively associates with and activates type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (InsP₃R1), an intracellular Ca²⁺ release channel (Tang et al. *Neuron*, 2003, **39**: 227—239). Based on these results, we proposed that the MSN degeneration in HD results from deranged neuronal Ca²⁺ signaling (Bezprozvanny, Hayden. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, **322**: 1310—1317). In support of this hypothesis we demonstrated that glutamate induces apoptosis of MSN primary cultures from YAC128 HD mouse model (Tang et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2005, **102**: 2606—2607). Furthermore, we demonstrated that clinically relevant NMDA antagonist memantine protects YAC128 MSN from glutamate-induced apoptosis (Wu et al. *Neurosci. Lett.*, 2006, **407**: 219—223). In addition to glutamatergic input from the cortex striatal neurons receive strong dopaminergic input from the substantia nigra. In experiments with YAC128 MSN neurons we discovered that glutamate and dopamine signaling pathways act synergistically to induce supranormal Ca²⁺ signals and to cause apoptosis of YAC128 MSN *in vitro* (Tang et al. *J. Neurosci.*, 2007, submitted). We demonstrated that potentiating

effects of dopamine are mediated by D1-class dopamine receptors (DARs) and not by D2-class DARs. Consistent with *in vitro* findings, in whole animal experiments we found that persistent elevation of striatal dopamine levels exacerbated the behavioral motor deficits and MSN neurodegeneration in YAC128 mice (Tang et al. *J. Neurosci.*, 2007, submitted). We further discovered that the clinically relevant dopamine antagonist tetrabenazine (TBZ) alleviated the motor deficits and reduced striatal cell loss in YAC128 mice (Tang et al. *J. Neurosci.*, 2007, submitted). Our results suggest that dopamine signaling pathway plays an important role in ND pathogenesis and that dopamine antagonists such as tetrabenazine exert potent neuroprotective effects in ND. Our findings suggest that dopamine antagonists such as tetrabenazine may have a therapeutic potential for treatment of ND beyond well established «symptomatic» benefit.

Support: Welch Foundation, HDSA, HDF, HighQ, NINDS.

MULTIPLE FUNCTIONS OF THE ORIGIN RECOGNITION COMPLEX. © *I. N. Chesnokov*. Department of Biochemistry and Molecular Genetics, University of Alabama at Birmingham, School of Medicine, Birmingham, AL 35294, Alabama, USA.

The origin recognition complex (ORC), a heteromeric six-subunit protein, is a central component for eukaryotic DNA replication. ORC binds to DNA at replication origin sites in ATP dependent manner and serves as a scaffold for the assembly of other key initiation factors. We have cloned the genes encoding the subunits of *Drosophila* ORC and reconstituted a functionally active ORC complex with recombinant proteins. Functional analysis of mutant and wild type ORC revealed motifs important for the replicative function of the complex. In addition to its well-documented role in the initiation of DNA replication ORC is also involved in other cell functions. Some of these activities directly link cell cycle progression with DNA replication, while other functions seem distinct from replication. ORC's function in the establishment of transcriptionally repressed regions is described for many species and may be a conserved feature common for both unicellular eukaryotes and metazoans. In addition, we found that the smallest of ORC subunits, Orc6, was localized at the cell membranes and at the cytokinesis furrows of dividing cells as well as in the nucleus. Silencing of Orc6 expression with dsRNA resulted in cytokinesis defects and the formation of multinucleated cells. Orc6 interacts with the *Drosophila* Peanut(pnut), a member of the septin family of proteins important for cell division. This interaction is mediated by a distinct C-terminal domain of Orc6. The core N-terminal domain of the Orc6 protein is important for the replicative functions of ORC and origin recognition. These results suggest that Orc6 has evolved two domains important for replicative and for cytokinesis functions of ORC. Our results also support the idea that ORC proteins participate in multiple aspects of the chromosome inheritance cycle in addition to their canonical role in initiating DNA replication.

WHAT THE NOSE TELLS THE OLFACTORY BULB ABOUT ODORS AND HOW THE BULB RESPONDS;

MEASUREMENTS WITH 1-PHOTON AND 2-PHOTON MICROSCOPY. © *L. Cohen*. Yale University, USA.

The processing of odorant information by the mammalian brain is well understood at the olfactory receptor neuron level but very poorly understood thereafter. We have measured the input from the nose to the olfactory bulb using calcium indicator dyes injected into the nose and transported to the glomeruli in the bulb. Using 1-photon (wide-field) imaging we were able to make maps of the input. The postsynaptic response to odorants has been difficult to measure with microelectrodes in vivo mammalian preparations. However it is easy using 2-photon microscopy and bulk loading of calcium indicator dyes. The measurements, from many individual juxtglomerular neurons, show a diversity of response types and a clustering of cells with different responses.

TRANSCRIPTION OF SATELLITE DNA IN OOCYTES AT THE LAMPBRUSH STAGE: IMMUNOFLUORESCENT AND CYTOGENETIC ANALYSIS. © *S. E. Derjushcheva, A. V. Krasikova, T. V. Kulikova, E. R. Gaginskaya*. Biological Research Institute of St. Petersburg State University, chromas@paloma.spbu.ru.

Recent studies on RNA interference have totally changed our view of the role of non-coding RNAs. Nowadays their participation in regulation of gene expression, chromatin organization and genome functioning is undoubted. Thus, studies on the location and transcription of highly repeated, non-coding sequences may well provide insight into fundamental issues of chromosome organization and function. The chromosomal distribution of 41 base pair tandem repeats, known as CNM and PO41 repeats in the chicken genome and *BgIII*-repeats in the Japanese quail, was analyzed precisely using giant lampbrush chromosomes (LBC) from growing oocytes. The PO41 repeat is conserved in all galliform species, whereas the other repeats are species-specific. In chicken and quail the centromere and subtelomere regions share homologous satellite sequences. Both the pericentromeric and subtelomeric clusters of the repeats are transcribed intensely in oocytes at the lampbrush stage during diplotene of prophase I. The data imply that the same machinery might be involved in the process of centromere and subtelomere heterochromatin formation. Ongoing transcription of the 41-bp repeats was demonstrated by incorporation of BrUTP injected into oocytes at the lampbrush stage. RNA complementary to both strands of CNM and PO41 repeats is present on chicken LBC loops, whereas strand-specific G-rich transcripts are characteristic of *BgIII*-repeats in the Japanese quail. Immunostaining with mAbs H14 and V22 against hyperphosphorylated elongating form of RNA polymerase II following by FISH to RNA transcripts showed the Pol-II-dependent transcription to occur on loops bearing satDNA. Interestingly, the RNA from 41-bp repeats does not undergo co-transcriptional U snRNP-dependent splicing. At the same time the ribonucleoprotein matrix of transcription units with C-rich RNA of CNM and PO41 repeats was enriched in hnRNP protein K. These characteristics of the loops transcribing satellite DNA reminded us nuclear stress bodies in human cells and omega speckles in *Drosophila*, containing satellite III and hsr ω transcripts, correspondingly.

The work was supported by RFBR (grant N 05-04-48252).

TWO-CELL EMBRYOS IN HIGH CONCENTRATIONS OF ALCOHOLS AND DMSO: OSMOTIC EFFECTS OR CHEMICAL TOXICITY? © I. I. Katkov,¹ A. G. Pogorelov.³ ¹UCSD Department Pediatrics, San Diego, California, USA, ²Stem Cell Center, Burnham Institute for Medical Research, La Jolla, California, USA, provincell@hotmail.com, and ³Institute of Theoretical and Applied Biophysics, Puschino, Moscow Region, Russia.

Vitrification (VF) is a promising approach for cryopreservation of embryos, tissues and organs. However, high concentrations of vitrification agents (VFAs) that are usually used in VF protocols may introduce both non-specific osmotic damage and specific alterations due to the chemical toxicity of a particular VFA. Intracellular concentrations of potassium and sodium in two-cell mouse embryos in G₁/S phase after exposition to vitrification solutions containing vitrificants ethane-1,2-diol (ethylene glycol — EG), propane-1,2-diol (propylene glycol — PG), or dimethyl sulfoxide (DMSO), and sucrose (S) after incubation in Dulbecco's solution were measured by electron probe microanalysis (EPMA). The 4-step protocol was as followed: 10 % VFA for 10 min ≥ 30 % VFA + 0.7 M S for 1.5 min ≥ 0.5 M S for 10 min ≥ 10 min pure Dulbecco's. The cytoplasmic concentration of potassium and sodium in immediately flashed out from the oviduct embryos was in range of 120 ± 2 mM, with good concordance with the previous data (CryoLetters, 2006, 27 : 87—98). Exposition in Dulbecco's for 30 min did not alter elemental composition, neither did exposition in PG or DMSO for 1.5 min. In contrast, exposition for 1.5 min in EG dropped the level of potassium to 96 ± 2 mM while elevating level of cytoplasmic sodium to 136 ± 3 mM. Further exposition to 30%-EG for 3 min lead in two-fold decrease of both elements (60 ± 3 mM and 66 ± 2 mM for K and Na respectively). In this paper, we also present mathematical modeling of the cell osmotic response using the relativistic permeability (RP) approach, which allows calculation of the osmotic curves without using simulation software but by direct calculations of the cell volume, intracellular concentration, and amount of the permeable vitrificants (Cryobiology, 2006, 53 : 402—403). Magnitude of the maximum cell volume excursion and other important osmotic characteristics were calculated for each step of the protocol, and the results of the mathematical modeling were superimposed onto the experimental data reported and discussed in the companion paper. The osmotic damage vs. specific chemical toxicity of the vitrificants as the major cause of the elemental disturbance of intracellular potassium and sodium content are discussed.

Source of travel support: CELLTRONIX, San Diego, California, USA (I.I.K.).

BIOMEDICAL APPLICATIONS OF SCANNING ION CONDUCTANCE MICROSCOPY. © Y. Korchev. Imperial College London, London Centre for Nanotechnology, Division of Medicine, BN5 Commonwealth Building, Hammer-smith Campus, Du Cane Road, London W12 0NN, UK.

Research in nanotechnology began with applications outside of biomedicine and is based on discoveries in physics and chemistry. This is because it is essential to understand the physical and chemical properties of molecules or complexes of molecules in order to control them. The same holds

true for the molecules and structures inside living tissues. We need more detail on the physical properties of intracellular structures, and how biology's molecular machines are built. This basis, in turn, will enable drug development and therapy. This approach ultimately requires the development of novel biophysical methods. For example, image living and functioning cells on the nanoscale and make quantitative measurements down to the level of individual molecules and their complexes. We have recently pioneered the development of an array of new and powerful biophysical tools based on Scanning Ion Conductance Microscopy that allow quantitative measurements and non-invasive functional imaging of single protein molecules in living cells. Scanning ion conductance microscopy and a battery of associated innovative methods are unique among current imaging techniques, not only in spatial resolution of living and functioning cells, but also in the rich combination of imaging with other functional and dynamical interrogation methods. These methods, crucially, will facilitate the study of integrated nano-behaviour in living cells in health and disease.

SIGNALLING EVENTS IN HOST-PARASITE COMMUNICATION AND INTERACTION. © K.-E. Magnusson, K. Tejle, E. Vikström. Division of Medical Microbiology, Department of Molecular and Clinical Medicine, Linköping University, SE-58185 Linköping, Sweden.

Micro-organisms and host cells meet each other at all body surfaces, and in the respiratory, urogenital and gastro-intestinal tracts. Due to the multiplicity of organisms and host cells it is an extremely complex event, involving all kinds of extra- and intracellular host cell receptors and pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) in the recognitions of each other. Under normal conditions there is a life-long balance between these players. Diseases are rare, but they can be life-threatening through the penetration of natural (innate) or immunological (acquired) barriers by virus, bacteria and parasites or their toxic products. We have therefore our attention for instance on the communication among bacteria through Quorum sensing (QS) and how QS molecules, like acyl-homoserine lactones (HSL) of *Pseudomonas aeruginosa*, affect the signals and physiology of host cells, like epithelial cells and macrophages. This is an example of indirect sensing of parasites in the environment, but most contacts are more direct through attachment, invasion or injection of toxins after the initial contact. We have here tried to elucidate how pathogenic bacteria (*Yersinia*, *Salmonella*, *Helicobacter*, *E. coli*), virus (*Rotavirus*, *Crimean Congo*) and parasites (*Leishmania*), as well as avirulent, normal flora-like bacteria, interact with different host cells, primarily cultured epithelial cells and phagocytic cells (neutrophils, macrophages, dendritic cells), and what signals are elicited in the host cells. These include activation of Ca²⁺ metabolism, generation of reactive oxygen species (O₂⁻, H₂O₂), protein phosphorylations/dephosphorylations, and filamentous actin remodelling, as well as altered transcription regulation, protein expression and communication within the host cells. To address these issues, new imaging techniques have been employed for visualizing the interactions, host cell responses and cellular structure, proteomics for assessing complex protein interactions and protein modifications and chemical sensing to measure specific responses. The presentation will illustrate the broad range of indirect and direct ways microbes and communicates with each other, how signals are transla-

ted into host cell responses and reprogramming. Understanding these events at the molecular and cellular level may provide new possibilities to prevent or interfere with more deleterious, disease processes.

Source of support: Swedish Research Council and the Swedish Institute (Visby Programme).

REGULATION OF MAJOR MITOCHONDRIAL CHANNEL — VDAC: IMPLICATION FOR APOPTOSIS. © *T. K. Rostovtseva*. Laboratory of Physical and Structural Biology, NICHD, NIH, Bethesda, MD, USA.

In biology, regulation of metabolite and other large molecular transport across cell and organelle membranes is a key factor for cell survival. One important example is apoptosis, programmed cell death, where mitochondria's crucial role is well established. During the initial stages of apoptosis (triggered by a number of different stimuli) the mitochondrial outer membrane (MOM) becomes permeable to apoptogenic factors such as cytochrome *C*. The release of these factors leads to caspase activation, DNA fragmentation and other characteristic changes associated with apoptotic cell death. It remains unclear exactly how MOM permeabilization occurs, and published results are often contradictory. VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel), a major permeability channel of the MOM, is a very attractive candidate for cytochrome *C* release pathway. Using VDAC channels reconstituted into planar lipid membranes, we demonstrated that, contrary to general belief, there is no functionally significant interaction between VDAC channel and pro-apoptotic protein Bax. However, another pro-apoptotic protein, tBid, affects the voltage-gating properties of VDAC by inducing channel closure. The mechanism by which tBid alters the gating properties of VDAC remains to be understood. We suggested that tBid affects VDAC indirectly through the lipid environment surrounding the proteins. The local regulation of MOM permeabilization, predominantly orchestrated by proteins of the Bcl-2 family, involves mitochondrial lipids. Cardiolipin (CL), the characteristic lipid from the mitochondria inner membrane, has been shown to play a crucial role in tBid targeting of MOM. CL is found in high concentration at mitochondria contact sites, where tBid and VDAC are preferentially located. We have found that CL induces significant voltage-gating asymmetry by making VDAC closure at *cis* negative voltages more favorable. CL is a non-lamellar li-

pid and is known to promote negative curvature in lipid structures. Furthermore, we have shown that another non-lamellar lipid, phosphatidylethanolamine (PE), also induces significant voltage-gating asymmetry of VDAC channels. We proposed the physical mechanism by which membrane proteins respond to the elastic stress of lipid packing and demonstrate an example of a coupling between the mechanical pressure in the hydrocarbon lipid region and protein conformational transitions (VDAC channel gating). We also utilized the well-studied gramicidin A channels as an internal control of the mechanical properties of the membranes used in the experiments with VDAC channels. The tentative implication of our findings for apoptosis is that specific lipid composition of the mitochondria outer membrane together with Bcl-2 family proteins could influence the outer membrane permeability by regulation of VDAC gating. For the first time we demonstrated the functional interaction between mammalian tubulin and mammalian VDAC channels reconstituted into planar phospholipid membranes. Tubulin induced reversible closure of VDAC channels at nanomolar concentrations. The involvement of VDAC in mitochondria-cytoskeleton interaction and regulation of mitochondria is discussed. Our results suggest a new general mechanism of regulation of mitochondrial outer membrane permeabilization under normal and apoptotic conditions.

CHARACTERIZATION OF POSSIBLE CELL TYPES PRODUCED BY POSTNATAL MOUSE NEURAL CREST-LIKE STEM CELLS. © *E. V. Sviderskaya*. Centre for Molecular and Metabolic Signalling, Division of Basic Medical Sciences, St. George's, University of London, UK.

Stem cells are cells that can both reproduce themselves and differentiate into functional cell types. Embryonic neural crest is pluripotent and generates the peripheral nervous system, melanocytes and some connective tissues. Here we describe pluripotent neural crest-like stem cells from neonatal mouse epidermis. These stem cells have been isolated as three independent immortal lines. They are able to generate Schwann precursor cells, functional melanocytes and the diversity of functional sensory neurons. The lines we established may be valuable for study of cell determination, melanoma biology and the possibility of postnatal neuron regeneration.

Supported by the Wellcome Trust.