

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ И СООБЩЕНИЙ,
ПРЕДСТАВЛЕННЫХ НА XVI ВСЕРОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ
«СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ КЛЕТОЧНОГО ЯДРА»

(Санкт-Петербург, 5—7 октября 2010 г.)

RESPONSE OF THE P53-MUTANT SOMATIC CELLS RESISTANT TO GENOTOXIC INSULTS DISPLAYS THE LIFE CYCLE FINGERPRINTS. © *J. A. Erenpreisa*,¹ *K. Salmina*,¹ *A. Huna*,¹ *A. P. Anisimov*.² ¹Latvian Biomedical Research and Study Centre, Riga, and ²Far-Eastern National University, Vladivostock, Russia.

Diploidy (polyploidy in relation to ancestral haploidy) appeared in evolution of eukaryotes together with the sexual process. Recombination exchange between paternal chromosomes and reduction of the chromosome number to haploidy during meiosis followed by fusion of paternal gametes are typical steps of the sexual process in mammals. Interestingly, that p53-non-functional human somatic tumour cell lines exposed to genotoxic insults often undergo cycling polyploidy and although the giant cells mostly die, some can successfully de-polyploidise and produce para-diploid survivors. Notably, the reactivation of the two gene cassettes has been shown by us to be involved in this survival response, meiotic with features of homologous recombination and chromosome reduction and of embryonic stem cells. It suggests that the processes of reversible polyploidy of tumour cells may be related to the life-cycle and germline biology. In this communication, we report some preliminary findings which fit with this hypothesis. Human diploid lymphoblastoma cell line WI-L2-NS was treated by acute gamma-irradiation, etoposide, paclitaxel or nocodazole (chemicals were applied for 20 hs) and monitored till clonogenic recovery on days 7—20 post-treatment. In addition, the irradiation experiments were carried out on the para-diploid Namalwa and Ramos lymphomas and hypertriploid HeLa cell line, clone 3. In all these cases, haploid paternal genome sets occasionally revealed their autonomy. Multinucleated post-irradiation tumour cells showed a large proportion of haploid fragments when tested by FISH with peri-centromeric chromosome probes and with DNA image cytometry. We noted in some endopolyploid cells a very peculiar process of the nuclear rearrangements by mitoses. These were composed of several bi-polar anaphasic plates reducing the DNA content of the daughter plates stepwise, from 8C, to 4C and 2C, in some of them to 1C. Alternatively, several equal sub-nuclei underwent simultaneous chromosome bridged bi-polar divisions. The daughter nuclei of neighbour bi-polar plates then fused in pairs showing the typical bi-lobed pattern. DNA cytometry of these bi-lobed nuclei revealed the para-2C DNA content, thus suggesting fusion of haploid genomes. The nuclear fusions were followed by radial cytotomy of giant cells aided by Aurora B cleaving cytoplasm for these nuclear products of pe-

dogamic fusions. However, in most cases the abscission did not occur as hindered by chromosome bridges and the cleavage furrows regressed. In some late giant cells, part of genetic material differentiated: it did not participate in these mitotic re-arrangements, stopped to synthesise DNA and down-regulated self-renewal transcription factors. Often, this inactive genetic material underwent autophagic degradation and was expelled from cells by contraction of the actin ring. Contrary to this, the active sub-nuclei of these same cells settled their individual centrosome and microtubular network and segregated their individual cytoplasmic territories by the new membrane. Ergastoplasmic reticulum was reactivated within these new cytoplasm territories as found by the protein disulfide isomerase and increased RNA staining. Interestingly, observations showed that simultaneously late giant cells released the old cytoplasm, poor in RNA and renewal factors, by blebbing. Notably, thus rejuvenated para-diploid descendents were enriched with the germline proteins NANOG and DMC1 and showed active Ag-NORs. They dissipated from the old mother cell and immediately renewed normal mitotic divisions. These observations suggest that p53-function deficient somatic tumour cells may resist genotoxic insults aberrantly entering the life-cycle-like process providing advantage for DNA repair and rejuvenation.

DIFFERENT MODES OF CELLDEATH INDUCED BY DNA DAMAGE. © *B. Zhivotovsky*. Institute of Environmental Medicine, Division of Toxicology, Karolinska Institute, Box 210, SE-17177 Stockholm, Sweden.

In dividing cells DNA damage caused by genotoxic insults results in the activation of cell cycle checkpoints followed by DNA repair to ensure the integrity of the transcribed genome. p53, being a «guardian of genome» is activated by stress and, depending on the severity of damage, it triggers either G1 or G2 arrest or cell death. DNA damage-induced apoptotic pathway includes caspase-2, which is activated within the PIDDosome complex, and causes cytochrome *c* release and caspase activation. Hence, PIDDosome-mediated caspase-2 activation might be an important link between DNA damage and the engagement of the mitochondria-mediated apoptotic pathway. In addition to PIDDosome, caspase-2 is able to use the CD95 DISC as a platform and the recruitment of caspase-8 to this complex is required for activation of both enzymes. Investigation of the contribution of p53 and caspase-2 to apoptosis and mitotic catastrophe (MC) induced by

DNA damage in carcinoma cells revealed that both functional p53 and caspase-2 are required for the apoptotic response, which was preceded by translocation of caspase-2 to the cytoplasm. In the absence of functional p53, DNA damage resulted in caspase-2-independent MC followed by necrosis. In these cells apoptotic functions could be restored by transient expression of wt-p53. Hence, in this experimental model p53 appeared to act as a switch between apoptosis and MC followed by necrosis-like lysis. It seems that the final mode of cell death triggered by DNA damage in cancer cells is determined by the profile of proteins involved in the regulation of the cell cycle.

ГЕОМЕТРИЯ ЦИСТ И МОРФОЛОГИЯ ХРОМАТИНА ТРОФОЦИТОВ В ОВАРИОЛАХ *CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA* MG. И *DROSOPHILA MELANOGASTER* MG. (DIPTERA). © Т. В. Ананьина, А. А. Коханенко, В. Н. Стегний. Научно-исследовательский институт биологии и биофизики Томского государственного университета, center_cu@res.tsu.ru.

У многих позвоночных и беспозвоночных организмов женские гониальные клетки делятся, формируя кластеры связанных между собой клеток (цисты). Как правило, клетки в цисте остаются связанными друг с другом. В зоне неполного цитокинеза формируются кольцевые каналы.

У *Calliphora erythrocephala* и *Drosophila melanogaster* циста формируется в результате четырех митотических делений цистобласта. 1 из клеток цисты является ооцитом, а 15 других выполняют трофическую функцию (питающие клетки или трофоциты). Для изучения геометрии цист и морфологии хроматина трофоцитов кольцевые каналы окрашивали фаллоидином, конъюгированным с флуорохромом (FITC), хроматин окрашивали DAPI. Анализировали серии оптических срезов и трехмерную реконструкцию цист, сделанную в программном модуле In-Side 4D (AxioVision Rel.4.7). Анализ пространственного расположения кольцевых каналов позволяет восстановить геометрию цисты. Графическая реконструкция цист в овариолах *C. erythrocephala* и *D. melanogaster* и отображение схем взаимосвязей клеток на плоскости показали, что в разных цистах они различны. Результаты исследования взаимосвязей между клетками говорят о том, что геометрия 16 клеточных цист в овариолах *C. erythrocephala* и *D. melanogaster* не влияет на дальнейшее функционирование цисты. В пределах одной овариолы у цист, следующих одна за другой, геометрия пространственного расположения клеток в цисте может различаться. Геометрия взаимосвязей между клетками в цисте зависит, очевидно, от того, в какой плоскости закладываются веретена деления каждого последующего митоза относительно плоскости, в которой произошли предыдущие деления.

После того как сформировалась циста, хроматин трофоцитов начинает политенизироваться. Процесс политенизации сопровождается морфологическими изменениями хроматина: тонкие фибриллы хроматина (в гермариин) при дальнейшей политенизации формируют политенные хромосомы, которые затем компактизируются и распадаются на составляющие их хроматиды. Хроматиды декомпактизируются, формируя ретикулярную структуру ядра. Был проведен анализ морфологии хроматина в зависимости от позиций, занимаемых трофоцитами в цисте. Оказалось, что чем ближе трофоцит расположен к ооциту, тем на бо-

лее поздней стадии морфологического преобразования находится хроматин, соответственно ядра имеют более высокий уровень плоидности. Так, если в наиболее удаленных от ооцита трофоцитах хроматин еще организован в политенные хромосомы, то в трофоцитах, непосредственно контактирующих с ооцитом, ядра уже имеют ретикулярную структуру. Поскольку процесс политенизации в трофоцитах начинается после того, как циста сформировалась полностью, можно предположить, что различия в морфологии хроматина ядер трофоцитов могут быть результатом либо разной скорости политенизации при одновременном начале этого процесса, либо тем, что соседние с ооцитом трофоциты начинают политенизироваться раньше других. Очевидно, имеет значение положение трофоцита в фолликуле, а не то, в результате какого из четырех митозов он произошел.

Исследование проводилось при финансовой поддержке ФЦП № П-801 и проекта № 2.1.1/774.

ВЛИЯНИЕ НЕОНАТАЛЬНОГО КРИПТОСПОРИДИОЗА НА ГЕНОМНЫЕ ДУПЛИКАЦИИ И ЭКСПРЕССИЮ ТЯЖЕЛЫХ ЦЕПЕЙ МИОЗИНА В КАРДИОМИОЦИТАХ КРЫС. © О. В. Анацкая, Н. В. Сидоренко, М. В. Харченко, [Т. В. Бейер], А. Е. Виноградов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, anatskaya@mail.cytspb.rssi.ru.

Замедление роста, воспаление и перегрузка сердца в раннем детстве тесно связаны с ишемической болезнью сердца, гипертонией и даже инфарктом миокарда у взрослых людей. Эту взаимосвязь называют онтогенетическим программированием. Точные ее механизмы пока не найдены. Для того чтобы прояснить эти вопросы, мы разработали модель гастроэнтерита средней тяжести, «запускающего» все основные программирующие факторы. Заболевание вызывали у крыс широко распространенным протозойным патогеном человека *Cryptosporidium parvum*. Сдвигая момент заражения день за днем, мы исследовали весь неонатальный период. С помощью методов цитофотометрии, иммуноцитохимии и конфокальной микроскопии мы сопоставили чувствительность желудочковых кардиомиоцитов в отношении содержания белка, формы, соотношения экспрессии изоформ тяжелых цепей миозина и плоидности. Наши данные показали, что даже 4-суточный гастроэнтерит вызывает атрофию кардиомиоцитов, почти двукратное увеличение отношения длины клеток к ширине, резкий сдвиг баланса экспрессии тяжелых цепей миозина α и β в сторону низкоскоростной цепи β и преждевременную гиперполиплоидизацию. Удивительно, чувствительность к заболеванию ядра и цитоплазмы клеток различалась принципиально. Кардиомиоциты отвечали активным накоплением геномов только в том случае, если гастроэнтерит приходился на 6—14-е сут после рождения, т. е. на период полиплоидизации клеток. Сократительные белки и форма клеток, напротив, чутко реагировали на протяжении всего неонатального периода. Учитывая то, что гиперполиплоидизация необратима и что она меняет профиль генной экспрессии, есть основания полагать, что геномные дупликации могут быть одним из инструментов онтогенетического программирования. Если это так, то критический период в развитии сердца приходится на время, когда кардиомиоциты меняют пролиферативный рост на гипертрофию, т. е. на время их полиплоидизации.

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ КОМПАКТИЗАЦИИ НУКЛЕОГИСТОННОГО И НУКЛЕОПРОТАМИННОГО ХРОМАТИНА В ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩИХСЯ СПЕРМИЯХ. © Е. А. Арифалин, Е. Е. Брагина, В. А. Замятина, Е. В. Шеваль, С. А. Гольшев, Л. Н. Кинцурашвили, Г. И. Кирьянов, А. Н. Прусов, В. Ю. Поляков. Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

Известно, что в процессе формирования мужских гамет у многих представителей эукариот каноническая нуклеогистоновая организация хроматина соматических клеток практически полностью перестраивается (ремоделируется) на молекулярном и структурном уровнях. В настоящее время в области изучения ремоделирования хроматина достигнут существенный прогресс, однако современные представления о структуре нуклеопротаминового хроматина остаются во многом гипотетическими.

Нами получены данные, которые позволяют описать ремоделирование хроматина в дифференцирующихся сперматидях человека как процесс последовательного замещения «элементарных» нуклеогистоновых ДНП-фибрилл на глобулярно-фибрилярные макрокомплексы более высокого порядка организации. На основе ранних работ (Prigent et al., 1996, 1998) и собственных наблюдений предложена динамическая модель организации нуклеопротаминового хроматина в сперматозоидах человека. Базовыми структурными единицами нуклеопротаминового хроматина, как и нуклеогистонового хроматина, являются петлевые домены, предположительно включающие в себя 10—50 тыс. пар оснований ДНК. По некоторым данным, в хромосомах соматических клеток петлевые домены формируют при участии гистонов и структурных белков негистонового типа дискретные глобулярные структуры — хромеры (Prusov et al., 1983).

На начальном этапе дифференцировки (предположительно в ранних сперматидях) гистоны модифицируются, частично замещаются тестис-специфическими вариантами, в результате макромолекулярные комплексы хроматина декомпактизируются до «элементарных» нуклеосомных фибрилл. В предлагаемой нами модели постулируется, что основания частично релаксированных петлевых доменов исходных хромеров после их декомпактизации остаются фиксированными специфическими структурными белками (возможно, белками ядерного матрикса). Все дальнейшие события, а именно репарирование однонитевых разрывов ДНК, деструкция нуклеосом, связывание ДНК с транзиторными белками и протаминами и реконденсация хроматина иницируются в локальных зонах ядер (глобулярных макрокомплексах), где располагаются основания петлевых доменов. Глобулярные макрокомплексы представляют собой временные структуры («фабрики» ремоделирования), включающие в себя транзиторные белки, белки ядерного матрикса (в том числе топоизомеразу II) и протамины. На более поздних этапах дифференцировки эти «фабрики» замещаются фибриллами толщиной около 40 нм. В зрелых сперматозоидах нуклеопротаминовый хроматин за счет формирования межмолекулярных дисульфидных связей переходит в состояние однородной по плотности массы, в которой не удастся идентифицировать отдельные структурные элементы.

Список литературы

Prigent Y., Muller S., Dadoune J. P. 1996. Immunoelectron microscopical distribution of histones H2B and H3 and protamines during human spermiogenesis. *Mol. Hum. Reprod.* 2 (12) : 929—935.

Prigent Y., Troalen F., Dadoune J. P. 1998. Immunoelectron microscopic visualization of intermediate basic proteins HPI1 and HPI2 in human spermatids and spermatozoa. *Reprod. Nutr. Develop.* 38 (4) : 417—427.

Prusov A. N., Polyakov V. Yu., Zatssepina O. V., Chentsov Yu. S., Fais D. 1983. Rosette-like structures from nuclei with condensed (chromomeric) chromatin but not from nuclei with diffuse (nucleomeric or nucleosomic) chromatin. *Cell Biol. Int. Rep.* 7 (10) : 849—858.

ПРОСТРАНСТВЕННОЕ ПОЛОЖЕНИЕ РАЙОНОВ ПРИКРЕПЛЕНИЯ ХРОМОСОМ В СИСТЕМЕ ЯДЕР ТРОФОЦИТОВ Фолликула малярийных комаров. © Г. Н. Артемов, Н. М. Немирович-Данченко, В. Н. Стегний. Томский государственный университет, center_cu@res.tsu.ru.

Изучение пространственной организации хромосом в ядре имеет большое значение для выявления механизмов функционирования генома и видообразования. Удобным объектом для определения принципов работы генетического материала в указанном аспекте являются малярийные комары комплекса *Anopheles maculipennis*. Виды малярийных комаров этого комплекса отличаются пространственной организацией хромосом в трофоцитах яичников: наличием/отсутствием контактов хромосом с ядерной оболочкой, положением района прикрепления на хромосоме и его морфологией (Стегний, 1979). У малярийных комаров фолликул образован ооцитом и семью трофоцитами, которые окружены фолликулярным эпителием. В трофоцитах *Anopheles* хромосома XL и хромосома 3 имеют жесткий контакт с ядерной оболочкой, а хромосома 2 к ядерной оболочке не крепится.

Изучали расположение района прикрепления хромосомы XL в ядрах трофоцитов *A. messeae* и *A. atroparvus* относительно ооцита. Районы прикрепления хромосом были выделены с помощью микродиссекции. Далее была проведена 3D-FISH ДНК-проб с ядрами трофоцитов в фолликуле и анализировалась их локализация в пространстве.

Для анализа отношения района прикрепления хромосомы XL относительно ооцита фолликулы с помощью математической программы помещали в систему координат, в которой плоскость XOY проходила через центры ядер трех трофоцитов, непосредственно связанных с ооцитом, а ось OZ соответствовала продольной оси фолликулы. Провели оценку углов, которые образованы вектором, проведенным от центра ядра трофоцита к району прикрепления хромосомы XL (ВРП) и осями координат. Так было проанализировано 70 ядер трофоцитов 10 фолликулов *A. messeae* и 58 ядер 12 фолликулов *A. atroparvus*, полученных от разных самок. При сравнении совокупности углов ВРП-ОХ с углами ВРП-ОУ и ВРП-ОZ по критерию Стьюдента было показано, что они не различались.

Были отмечены также случайные координаты районов прикрепления и углы случайных ВРП с осями ОХ, ОУ и ОZ в качестве контроля. С использованием критерия Стьюдента оценивали различия между совокупностями углов ВРП-ОХ, ВРП-ОУ и ВРП-ОZ, полученных в экс-

перименте, с соответствующими случайными углами ВРП-ОХ, ВРП-ОУ и ВРП-ОZ. Сравнение не показало статистически значимых отличий локализации районов прикрепления хромосомы XL от случайных. Таким образом, можно сделать вывод о том, что пространственная организация хромосомы XL в системе семи трофоцитов является случайной по отношению к ооциту.

Исследования проводились при финансовой поддержке ФЦП № П-801 и П-1702.

ДЛИНА И ЭКЗОН-ИНТРОННАЯ СТРУКТУРА ГЕНА СВЯЗАНА С ВРЕМЕНЕМ ЕГО РЕПЛИКАЦИИ. © В. Бабенко,¹ Ф. Гончаров.² ¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, bob@bionet.nsc.ru. ² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, federix@ya.ru.

Структура хроматина в геноме эукариот представляет собой чередующиеся районы ранней и поздней репликации (Woodfine et al., 2004). Мы исследовали экзон-интронный состав генов *Drosophila melanogaster*, содержащихся отдельно в районах ранней и поздней репликации. В результате анализа выяснилось, что существует значимая корреляция длины гена и времени его репликации. Выяснилось также, что гены, расположенные в районах поздней репликации, обладают большей вариацией длины интронов, чем раннереплицирующиеся гены, что позволяет предположить существование отбора по длине в районах ранней репликации.

Мы аппроксимировали распределение плотности интронов в ранне- и поздне-реплицируемых районах гамма-распределениями. Статистическое сравнение гамма-распределений подтвердило уменьшенный коэффициент λ в разреженных районах (соответственно средняя плотность интронов больше), что свидетельствует о релаксированном режиме эволюции по экзон-интронной структуре в разреженных районах. Релаксация поздне-реплицированных районов также подтверждается повышенным числом точечных замен при сравнении ортологичных генов двенадцати видов группы *Drosophila* в районах поздней репликации.

Список литературы

Woodfine K., Fiegler H., Beare D. M., Collins J. E., McCann O. T., Young B. D., Debernardi S., Mott R., Dunham I., Carter N. P. 2004. Replication timing of the human genome. Hum. Mol. Genet. 13 (2): 191—202.

УЛЬТРАСТРУКТУРА ЯДЕРНЫХ СУБКОМПАРТМЕНТОВ КЛЕТОК АПИКАЛЬНОЙ МЕРИСТЕМЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ. © Е. Н. Баранова,¹ А. А. Гулевич.^{1,2} ¹ВНИИСБ РАСХН, Москва, и ²ВНИИК им. В. Р. Вильямса РАСХН, пос. Луговая, Московская обл.

В работе изучали ультраструктурную организацию ядерных субкомпарментов меристематических клеток проростков пшеницы и ячменя при проращивании их в условиях неблагоприятных значений рН и действия солей. Ранее не проводилось изучение структуры ядерных компонентов, содержащих РНК, при данных воздействи-

ях. Было предположено, что неблагоприятное действие абиотических факторов, которые, ограничивая рост, развитие и часто приводя к гибели растений, в случае действия на уровне порога возможной адаптации, которая сопряжена с экспрессией защитных белков, а соответственно и с транскрипцией генов, может оказывать влияние на ультраструктурную организацию ядра и его компарментов, содержащих РНК (ядрышки, РНП-тельца и другие структуры).

При идентификации различных структур внутри ядра использовалась условная классификация, по которой выделялись ядрышки; образования, подобные ядрышкам; ядерные тельца, расположенные в разных частях ядра, в том числе «тельца Кахала»; speckles-подобные образования. Для подтверждения РНП-природы этих субкомпарментов использовали классические техники — импрегнацию серебром и регрессивное окрашивание с применением ЭДТА.

Предполагалось, что ультраструктурные проявления, связанные с преобразованием ядерного компартамента, должны быть если не идентичными, то весьма схожими при разных типах абиотических воздействий, так как во многих случаях при адаптивной реакции на различные стрессы у растений бывают задействованы одни и те же молекулярные и биохимические механизмы как при рецепции сигнала, так и при реализации ответа. Однако в нашем исследовании установить подобную идентичность не удалось. Так, при сравнении клеток меристематических тканей проростков, прораставших при рН 3.5, 6.0 и 8.0, показано, что действие экстремальных значений рН вызывает изменения всех РНП-содержащих субкомпарментов, однако эти проявления имеют значительные различия. Например, в обоих случаях можно наблюдать мелкие ядерные тельца, но при рН 3.5 эти тельца чаще имеют неправильную форму и, вероятно, могут быть аналогичны микроядрам, которые появляются при активации латентных ядрышковых организаторов при действии 5-азациитидина. При рН 8.0 большая часть ядер интерфазных клеток содержит множество телец правильной округлой формы, имеющих рыхлую гранулярную структуру, отличную от структуры ядрышка. Часть телец расположена рядом с ядрышками или иногда внутри ядрышек. Встречаются тельца, расположенные в нуклеоплазме по обе стороны фрагмента конденсированного хроматина попарно.

При изучении действия солей (NaCl и Na₂SO₄) также не было установлено значимой корреляции со структурой ядрышка и РНК-содержащих субкомпарментов. Различия были отмечены как в ультраструктуре ядрышек, что проявлялось в различных соотношениях гранулярного и фибриллярного компонентов, так и в ультраструктуре других внутриядерных образований.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке программы РАСХН 04.03.03.01 и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-08-01137-а).

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ F-АКТИНА В ЯДЕРНОМ АППАРАТЕ ИНФУЗОРИИ *PARAMECIUM CAUDATUM*. © К. А. Бенкен, Е. В. Сабанеева. Кафедра цитологии и гистологии биолого-почвенного факультета С.-Петербургского государственного университета.

В настоящее время общепризнано, что актин, долгое время считавшийся исключительно цитоплазматическим

белком, является важным компонентом клеточного ядра. Актин был обнаружен в ядрах таких известных модельных объектов, как *Xenopus laevis*, *Dictyostelium discoideum* и *Physarum polycephalum*. Показано, что актин не только выполняет структурную функцию, но и играет важную роль в функционировании генома, принимая непосредственное участие в процессе транскрипции.

Вопрос о наличии актина в ядерном аппарате инфузорий остается практически неизученным, хотя в литературе неоднократно высказывались подобные предположения (Райков, 1978). Вместе с тем есть все основания полагать, что именно наличием ядерного актина и разнообразием его функций может объясняться ряд особенностей морфофункциональной организации амплиплоидных макронуклеусов инфузорий (крупные размеры ядра в отсутствие ламины, инвертированное расположение компонентов ядрышек, сегрегация геномов при делении макронуклеуса).

Нам удалось показать присутствие актина в ядрах инфузории *Paramecium caudatum* с помощью обработки TRITC-фаллоидином тотальных препаратов клеток, парафиновых срезов и выделенных ядер. Антитела к изоформе актина 1-1 *P. aurelia* не связывались с ядерным актином, что свидетельствует о наличии в ядерном аппарате *P. caudatum* изоформ, отличных от изоформы 1-1.

Интенсивная флуоресценция TRITC-фаллоидина наблюдалась в макронуклеусе (за исключением его ахроматиновой зоны) и в макронуклеусе по всему ядру (кроме зоны ядрышек, где свечение наблюдалось лишь изредка). Таким образом, в обоих ядрах F-актин выявляется в области локализации хроматина. Применение конфокальной микроскопии позволило отчетливо продемонстрировать неравномерность распределения актина в макронуклеусе. Интенсивность флуоресценции в области экстрахромосомных ядрышек в макронуклеусе варьировала предположительно в зависимости от стадии ядрышкового цикла: от полного отсутствия до флуоресценции по периферии и интенсивной флуоресценции всего объема ядрышек. В некоторых случаях в центре равномерно окрашенного макронуклеуса выявлялось сферическое тельце диаметром 1.5—3.0 мкм, характеризующееся высоким содержанием F-актина. Такие ядра, возможно недавно претерпевшие деление, имеют небольшие размеры и не содержат крупных ядрышек.

При стабильном заражении ядер симбионтами (бактерией *Holospira obtusa* в случае макронуклеуса и бактерией *H. undulata* в случае микронуклеуса) уменьшается интенсивность флуоресценции меченного флуорохромом фаллоидина в соответствующем ядре. В то же время в некоторых инфицированных ядрах наблюдаются компактные зоны, интенсивно окрашивающиеся TRITC-фаллоидином.

Список литературы

Райков И. Б. 1978. Ядро простейших. Морфология и эволюция. Л.: Наука. 328 с.

ОРГАНИЗАЦИЯ ХРОМОСОМ В МЕЙОЗЕ. © Ю. Ф. Богданов, С. Я. Дадашев, С. Е. Спангенберг, О. Л. Коломиец. Институт общей генетики РАН, Москва, yubogdanov@vigg.ru.

Хромосомы в профазе I мейоза имеют петельно-осевую организацию. На стадии пахитены осью хромосомы

служит синаптонемный комплекс (СК). Петли хроматина прикреплены к латеральным элементам СК. Остается неизвестным, какие последовательности ДНК связывают хроматин с белками латеральных элементов СК.

В нашей лаборатории было установлено, что фракция ДНК мыши и хомячка, тесно связанная с СК (СКАР ДНК), обогащена простыми повторами (GT/CA)_n и повторами B1 (Карпова и др., 1989, 1995). Установлено также, что СКАР ДНК крысы обогащена повторами SINE и LINE (Pearlman et al., 1992). Такие повторы ассоциируют с белком SYCP3 латеральных элементов СК у мыши и, возможно, прикрепляют ДНК к СК (Hernández-Hernández et al., 2008). Таким образом, накопились факты в пользу неслучайной ассоциации некоторых повторяющихся последовательностей ДНК-нуклеотидов с СК и возможного участия этих повторов ДНК в прикреплении хроматина к латеральным элементам СК. В пользу такого предположения свидетельствует также то, что ультраструктура латеральных элементов СК не имеет локусной специфичности. Кроме того, установлено, что последовательности СКАР ДНК весьма консервативны среди позвоночных животных (Пенкина и др., 2008), и логично предполагать, что повторы нуклеотидов могут быть наилучшим материалом для ДНК-белковых связей при построении СК.

Для проверки этого предположения мы использовали гибридизацию *in situ* синтетических олигонуклеотидов ДНК с хромосомами на микропрепарах пахитенных сперматоцитов мыши. Мы установили, что сигналы ДНК-зондов MaLR, MER, B4 и (GT)₂₂ диспергированы в кариоплазме, в то время как сигналы гибридизации B1 (*Alu*), L1, B2-повторов и мини-сателлита локализуются преимущественно вблизи СК. Эти результаты согласуются с моделью организации мейотической хромосомы и СК (Дадашев и др., 2005), построенной на основе изучения горячих и холодных точек рекомбинации в геноме человека.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-01725) и программы президиума РАН «Биологическое разнообразие».

Список литературы

Дадашев С. Я., Гришаева Т. М., Богданов Ю. Ф. 2005. Идентификация и характеристика *in silico* последовательностей ДНК, функционирующих в мейозе (мейотической ДНК). П. *AluJb*, возможно, участвуют в прикреплении петель хроматина к синаптонемному комплексу. Генетика. 41 (12): 1707—1713.

Карпова О. И., Пенкина М. В., Дадашев С. Я. и др. 1995. Особенности первичной структуры ДНК из синаптонемного комплекса золотистого хомячка. Молекуляр. биол. 29 (3): 512—521.

Карпова О. И., Сафронов В. В., Зайцева С. П., Богданов Ю. Ф. 1989. Некоторые свойства ДНК из выделенной фракции синаптонемных комплексов мышей. Молекуляр. биол. 23 (2): 571—579.

Пенкина М. В., Карпова О. И., Захаревич Н. В. и др. 2008. Семейство СКАР-ДНК обогащено консервативными последовательностями. Молекуляр. биол. 42 (2): 362—369.

Hernández-Hernández A., Rincón-Arango H., Recillas-Targa F. et al. 2008. Differential distribution and association of repeat DNA sequences in the lateral element of the synaptonemal complex in rat spermatocytes. Chromosoma. 117 (1): 77—87.

Pearlman R. E., Tsao N., Moens P. B. 1992. Synaptonemal complexes from DNase-treated rat pachytene chromosomes contain (GT)_n and LINE/SINE sequences. Genetics. 130 (4): 865—872.

КЛАСТЕРЫ ИНТЕРХРОМАТИНОВЫХ ГРАНУЛ ООЦИТОВ НАСЕКОМЫХ: УЧАСТИЕ В НАКОПЛЕНИИ ПОЛИАДЕНИЛИРОВАННЫХ РНК И БЕЛКОВ ГЕТЕРОГЕННЫХ ЯДЕРНЫХ РНП. © Д. С. Боголюбов, Ф. М. Баталова, А. С. Веселова, В. Н. Парфенов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, dmitr@mail.cytspb.rssi.ru.

Кластеры интерхроматинных гранул (КИГ), известные также как ядерные «speckles», — одни из универсальных и эволюционно консервативных ядерных доменов эукариотической клетки. Их основная функция состоит во временном депонировании факторов сплайсинга пре-мРНК — малых ядерных РНП и SR-белков. Исследования последних лет показали, что КИГ соматических клеток млекопитающих могут быть также вовлечены в другие ядерные функции, включая удержание (retention, sequestration) мРНК перед ее экспортом в цитоплазму. В ооцитах различных насекомых КИГ заметно отличаются от таковых в соматических клетках млекопитающих как по тонкому строению, так и по молекулярному составу (Bogolyubov et al., 2009. BioEssays. 31 : 400—409). Морфологически они представляют собой сложные ядерные тельца, состоящие из гранулярного и фибриллярного материала различных типов. В настоящей работе исследованы КИГ ооцитов двух видов насекомых: скорпионницы *Panorpa communis* (Mesoptera: Panorptidae) и большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* (Coleoptera—Polyphaga: Tenebrionidae), имеющих мероистические яичники различного строения (политрофные и телотрофные соответственно). Идентификацию КИГ в ядрах ооцитов насекомых проводили с помощью антител к фактору сплайсинга SC35 — молекулярному маркеру этих ядерных доменов. Для локализации поли(A)⁺-РНК были проведены микроинъекции в ооциты флуоресцентно меченных метилолигорибонуклеотидов 2'-O-Me(U)₂₂. Белки гетерогенных ядерных (гя) РНП, принадлежащие к семейству A/B, в том числе наиболее распространенный из них белок A1, локализованы иммуноцитохимически с помощью соответствующих специфических антител (конфокальная микроскопия). Следует подчеркнуть, что белку A1 в настоящее время отводится важная роль в экспорте мРНК. Обнаружено, что подавляющее большинство КИГ ооцитов исследованных насекомых содержит все перечисленные выше компоненты. Более того, обработка препаратов РНКазой свидетельствует о том, что накопление белков гяРНП в КИГ осуществляется по РНК-зависимому типу. Соответственно обработка РНКазой не влияла на локализацию в КИГ белка SC35, который не является РНК-связывающим белком. Накопление в КИГ ооцитов насекомых белка A1 — одного из активных участников ядерного экспорта мРНК — указывает на существенную роль этих ядерных доменов в распределении, удержании и транслокации мРНК из ядра в цитоплазму. Наши данные, таким образом, подтверждают разрабатываемую на материале соматических клеток млекопитающих концепцию того, что КИГ служат не только депо факторов сплайсинга, но и принимают непосредственное участие в процессах, связанных с удержанием мРНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00723) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНОСТЬ — ОБЩЕЕ СВОЙСТВО ЭКСТРАХРОМОСОМНЫХ УНИВЕРСАЛЬНЫХ ДОМЕНОВ НУКЛЕОПЛАЗМЫ. © Д. С. Боголюбов, В. Н. Парфенов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, vladparf@mail.cytspb.rssi.ru.

Трехмерная архитектура клеточного ядра регулирует процессы экспрессии генов, участвует во внутриядерном распределении их молекулярных факторов. Существуют специфические экстрахромосомные ядерные домены, которых в настоящее время выделяют около 10 и в которых локализуются эти факторы. Среди таких доменов наряду с ядрышком наиболее хорошо охарактеризованными являются тельца Кахала (ТК) и кластеры интерхроматинных гранул (КИГ), представленные в ядрах различных типов клеток и рассматриваемые как универсальные и эволюционно консервативные домены нуклеоплазмы. В течение определенного периода функциональное значение ТК и КИГ сводили преимущественно к депонированию либо факторов транскрипции (ТК), либо компонентов сплайсинга (КИГ). И только сведения последнего времени поставили вопрос об их возможной полифункциональности. Так, поскольку в ТК обнаруживаются компоненты транскрипционных комплексов всех трех РНК-полимераз, а также U7 малая ядерная (мя) РНК, этим доменам отводится роль депонирования/сборки факторов транскрипции различных РНК и процессинга 3'-конца мРНК гистонов. Вопрос о новых функциях ТК был поставлен в связи с открытием в их составе специфических малых РНК (U85, U87, U88, U89, U90 и U91) и обоснованием роли этих РНК в сайт-специфическом метилировании и псевдоуридинилировании остатков рибозы U1, U2, U4 и U5 мяРНК — ведущих факторов сплайсинга пре-мРНК. Таким образом, впервые не только сделано важнейшее уточнение молекулярного состава ТК, но и продемонстрирована их активная роль в посттранскрипционных модификациях сплайсинга мяРНК. За последние 10 лет существенно изменились представления и о функциях другого универсального ядерного домена — КИГ. Если до недавнего времени в качестве единственной функции этих доменов рассматривали хранение/рециклирование факторов сплайсинга (мяРНК и SR-белков), то сейчас к этой функции добавился ряд важнейших других. Среди них, во-первых, активная роль КИГ в качестве функционально-архитектурных центров ядра, замыкающих на себя интенсивно транскрибируемые гены и тем самым организующих межхромосомные взаимодействия для усиления эффективности экспрессии этих генов. Фактически КИГ могут обеспечивать эффективное сопряжение процессов инициации транскрипции, элонгации первичного транскрипта и различные этапы процессинга пре-мРНК. Во-вторых, показана прямая роль КИГ в процессинге (сплайсинге) пре-мРНК. Доводами в пользу такого утверждения явились данные по формированию в КИГ сплайсосомных комплексов после инъекции в клетки компетентных к сплайсингу пре-мРНК и факторов сплайсинга, а также отсутствие аккумуляции в КИГ форм РНК с исключенными интронными последовательностями или фрагментами в 3'-сайтах сплайсинга. В-третьих, продемонстрировано участие КИГ в экспорте мРНК. Исследования показали, что около 75 % ядерной поли(A)⁺-РНК проходит через КИГ. Выдвинута гипотеза о том, что накопление в КИГ является общим свойством всех типов мРНК; в этих доменах определяются точность сплайсинга и компетентность мРНК к экспорту. Сам же

по себе факт накопления мРНК в КИГ может обеспечить структурное обоснование разрабатываемой концепции внутриядерного удержания (retention, sequestration) мРНК, которое может модулировать скорость экспорта РНК, а также обеспечивать качественный контролирующийся механизм этого экспорта. Решение таких задач требует, вероятно, формирования в КИГ специфических экспортных комплексов, включающих в себя ряд известных факторов экспорта: например, NXF1/TAP и белков-адаптеров, среди которых важнейшими являются REF/Aly, а также фактор сплайсинга Y14. В связи с ядерным экспортом пре-мРНК рассматривается также роль белков гетерогенных ядерных (гя) РНП семейства А/В, в первую очередь его представителя — белка А1, имеющего для целей транспорта ряд преимущественных свойств (наличие сигнала ядерного экспорта, челночные свойства). Дополнительно обсуждается возможное участие ядерного актлина в построении комплексов ядерного экспорта мРНК. Мы обсуждаем также выдвинутую нами на основании собственных данных рабочую гипотезу о формировании в составе КИГ транспортного комплекса РНК—факторы экспорта—актин.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00723) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

КЛАСТЕРЫ ИНТЕРХРОМАТИНОВЫХ ГРАНУЛ В ПЕРИОД АКТИВАЦИИ ЭМБРИОНАЛЬНОГО ГЕНОМА: МОРФОДИНАМИКА И РОЛЬ В РАСПРЕДЕЛЕНИИ КОМПОНЕНТОВ ЯДЕРНОГО МЕТАБОЛИЗМА мРНК. © И. О. Боголюбова, И. И. Иванова, Д. С. Боголюбов, В. Н. Парфенов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ibogol@mail.ru.

Кластеры интерхроматиновых гранул (КИГ, SC35-содержащие домены, или «speckles») — важнейшие ядерные домены, напрямую вовлеченные в процессы метаболизма мРНК. С помощью комплексных подходов (непрямой иммунофлуоресценции, иммуноэлектронной микроскопии, микроинъекций флуоресцентно меченных метилолигорибонуклеотидных зондов, а также ингибиторного анализа) получены новые данные об особенностях морфодинамики и молекулярного состава КИГ в ядрах ранних эмбрионов мыши.

Как известно, на начальных стадиях дробления в ядрах эмбрионов млекопитающих процессы синтеза мРНК не происходит, а реализация программы индивидуального развития осуществляется под управлением регуляторных макромолекул, накопленных в процессе оогенеза. Сложный комплекс структурных и функциональных преобразований, проходящих в ядрах эмбрионов и приводящих в итоге к реактивации процесса транскрипции, получил название «активация эмбрионального генома» (АЭГ).

Показано, что на ранних стадиях эмбриогенеза, соответствующих основным этапам АЭГ, параллельно с возрастанием транскрипционной активности ядер происходит увеличение размеров КИГ; при этом средние размеры КИГ в эмбрионах мыши меньше, чем в соматических клетках.

В то же время установлено, что некоторые ведущие компоненты ядерного метаболизма мРНК (РНК-полимераза II, базальный фактор транскрипции TFIID) присутст-

вуют в КИГ эмбрионов с различной транскрипционной активностью ядер. Кроме того, было обнаружено, что вне зависимости от транскрипционной активности ядер поли(А)⁺-РНК и белки семейства А/В гетерогенных ядерных РНП, участвующие в экспорте мРНК, локализируются в КИГ. Показано, что А/В гяРНП ассоциированы с КИГ по РНК-зависимому типу. Между тем фактор экспорта мРНК NXF1/TAP начинает выявляться в составе КИГ только в условиях искусственного подавления транскрипции с помощью соответствующих ингибиторов (например, актиномицина D).

Обсуждаются особенности структурно-функциональной организации КИГ эмбрионов млекопитающих в сравнении с КИГ соматических клеток, а также их существенная роль в удержании пре-мРНК и накоплении факторов экспорта мРНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 09-04-00723, 07-04-00685) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

РАННИЕ ЭМБРИОНЫ МЫШИ КАК НОВЫЙ МОДЕЛЬНЫЙ ОБЪЕКТ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РОЛИ АКТИНА В ЯДРЕ. © Н. А. Боголюбова, И. О. Боголюбова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Механизмы функционирования актлина в ядре соматической клетки и их регуляция, а также форма, в которой актин присутствует в ядре, в настоящее время активно изучаются. Вместе с тем участие актлина в метаболизме ядер ранних эмбрионов млекопитающих до сих пор остается практически неисследованным. В данной работе доимплантационные зародыши мыши были использованы как новая модель для изучения локализации актлина в ядре и идентификации его внутриядерных форм. Актин в ядрах эмбрионов двухклеточной стадии и пронуклеусах зигот был помечен маркерами с разным механизмом связывания с молекулой актлина, что предопределяло их способность визуализировать определенные функциональные формы актлина (мономерную, фибриллярную, иные формы полимеризованного актлина). Мы впервые применили подход, сочетающий в себе метод прямой детекции актлина с использованием флуоресцентно меченных фаллоидина и ДНКазы I, с одной стороны, и метод непрямого иммунофлуоресцентного мечения актлина с применением антител к фрагментам N-концевого и C-концевого доменов его молекулы — с другой. В ядрах двухклеточных зародышей было показано присутствие агрегатов мономерного актлина и двух олигомерных форм актлина, различающихся по характеру их внутриядерного распределения. Олигомерная форма актлина, выявляемая антителами к C-концевому домену, ассоциирована с областями конденсированного хроматина. Мономерный актин и его олигомерная форма, выявляемая антителами к N-концевому домену, напротив, обнаруживаются в местах локализации диспергированного хроматина. Аналогичным образом проведенный анализ локализации актлина в пронуклеусах зиготы продемонстрировал присутствие в обоих родительских пронуклеусах мономерного актлина и его форм, визуализируемых антителами к N- и C-концевым доменам. Мечение актлина с помощью антител к C-концевому домену выявило морфологическую асимметрию родительских пронуклеусов. Интенсивность мечения женского

пронуклеуса всегда была значительно выше, чем мужского. При этом в женском пронуклеусе наблюдалась четкая солокализация актина с конденсированным хроматином, тогда как в мужском пронуклеусе такая солокализация отсутствовала. После окрашивания TRITC-фаллоидином двухклеточных зародышей и зигот флуоресценции в местах расположения ядер не наблюдали, что свидетельствует об отсутствии в них классических актиновых филаментов.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в ядрах одно- и двухклеточных эмбрионов, как и в ядрах соматических клеток, актин присутствует в нескольких формах, которые, по-видимому, несут разную функциональную нагрузку.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-00757) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

ИНДУКЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ В РАЙОНАХ ИНТЕРКАЛЯРНОГО ГЕТЕРОХРОМАТИНА ДРОЗОФИЛЫ ИЗМЕНЯЕТ ХАРАКТЕР РЕПЛИКАЦИИ ЭТИХ РАЙОНОВ.
© М. И. Болтенгаген, С. А. Демаков, Е. С. Беляева. Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, zhimulev@mbc.nsc.ru.

Интеркалярным гетерохроматином в политенных хромосомах *Drosophila melanogaster* называют участки, имеющие сходство с классическим прицентромерным гетерохроматином, которые рассеяны (интеркалированы) в эухроматиновых плечах хромосом.

Районы интеркалярного гетерохроматина представлены, как правило, кластерами уникальных генов (от 6 до 40), которые занимают в среднем около 300 т.п.н. ДНК и находятся в состоянии эпигенетического сайленсинга в политенных хромосомах. В геномах других высших организмов такие кластеры также присутствуют, но только в политенных хомосомах возможно их подробное изучение на молекулярном и цитогенетическом уровнях как структурно-функциональных единиц хромосом.

Наиболее яркими чертами интеркалярного гетерохроматина являются плотная упаковка хроматина и транскрипционная неактивность, в результате которых такие районы выглядят как плотные темные диски.

Сайленсинг районов сопровождается, как правило, поздним завершением их репликации в S-фазе клеточного цикла. В политенных хромосомах, проходящих последовательные циклы эндорепликации, районы интеркалярного гетерохроматина не успевают завершить репликацию полностью и ДНК в них недопредставлена на большом протяжении, в результате образуются домены поздней репликации — недорепликации.

Остаются неясными причины поздней репликации в районах интеркалярного гетерохроматина и их связь с неактивным состоянием генов. Важно выяснить, регулируется время репликации на уровне отдельных генов домена или на уровне целого домена. Главной целью данной работы было определить, насколько статус репликации в интеркалярном гетерохроматине связан с состоянием транскрипционной активности этих районов. Для этого было необходимо изучить степень представленности ДНК в районе интеркалярного гетерохроматина после активации транскрипции и подавления эпигенетического сайленсинга.

Мы разработали систему, позволяющую избирательно индуцировать транскрипцию внутри районов интеркалярного гетерохроматина с помощью транспозона P{EPgy2}, встроенного в эти районы. Транспозон P{EPgy2} содержит маркерные гены *yellow* и *mini-white*. На 3'-конце элемента находится промотор и энхансер GAGA/Gal4-UAS. Мы использовали драйвер AB1-Gal4, работающий в слонных железах личинок. Активность драйвера Gal4 приводит к индукции транскрипции геномной последовательности, находящейся под промотором UAS встроенного транспозона.

В результате активации в политенных хромосомах в местах встройки образуется пуфф, что свидетельствует об индукции транскрипции в данном районе.

Методом Саузерн-блот-гибридизации было обнаружено, что при транскрипционной активации транспозона P{EPgy2} в районе интеркалярного гетерохроматина 11A в политенных хромосомах слонных желез исчезает недорепликация во всем районе на протяжении 450 т.п.н., которые в отсутствие транскрипции являются недореплицированными.

Таким образом, показано, что транскрипционная активность способна изменять статус репликации в кластерах генов, находящихся в норме в состоянии эпигенетического сайленсинга.

АКТИНСВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК АЛЬФА-АКТИНИН 4 В РЕГУЛЯЦИИ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА NF-kappaB.
© А. Большакова,¹ К.-Е. Магнуссон,² О. Петухова.¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и ² Университет г. Линчепинга, Швеция.

Одной из возможных функций актинсвязывающих белков является участие в регуляции экспрессии генов на уровне взаимодействия с транскрипционными факторами. Альфа-актинин 4 относится к таким белкам. Ранее было показано, что альфа-актинин 4 и субъединица RelA/p65 транскрипционного фактора NF-kappaB солокализуются в цитоплазме клеток A431, и продемонстрировано присутствие актинина 4 в ядерных и цитоплазматических иммунопреципитатах, осаждающихся антителами к субъединице RelA/p65 NF-kappaB. В настоящей работе было решено проверить возможность прямого взаимодействия актинина с p65-субъединицей NF-kappaB и участия актинина в регуляции NF-kappaB.

С использованием метода GST-pull down было показано, что N-концевая последовательность RelA/p65 взаимодействует с актином напрямую. Возможность участия альфа-актинина 4 в регуляции ДНК-связывающей активности NF-kappaB была исследована методом торможения ДНК-белковых комплексов в акриламидном геле. Реакцию связывания биотинилированной консенсусной последовательности kappa B с очищенными N- и C-концевыми последовательностями субъединицы RelA/p65 NF-kappa B проводили в присутствии коммерческого альфа-актинина 4, сшитого с последовательностью GST. Использовали полноразмерный альфа-актинин 4 и C-концевой фрагмент актинина 4. Показано, что только N-концевая последовательность kappa B взаимодействует с консенсусом. При добавлении в реакцию связывания как полноразмерный актинин 4, так и его фрагмент вытесняют p65 из комплекса с консенсусной последовательностью. Однако между этими двумя образцами наблюда-

ются различия в количестве белка, необходимого для вытеснения р65-субъединицы из комплекса с ДНК: полноразмерный актинин 4 характеризовался меньшей долей белка по сравнению с укороченной формой, необходимого для вытеснения р65. Преинкубация актининов с р65 приводила к снижению доли актинина, необходимого для вытеснения р65 из комплекса с ДНК. Контрольные эксперименты показали, что рекомбинантные актинины не связываются с консенсусной последовательностью.

Присутствие актинина 4 среди белков, взаимодействующих с карра В было исследовано также Вестерн-блот-анализом после взаимодействия ядерных экстрактов клеток А431 с биотинилированными консенсусными последовательностями карра В и последующей очистки специфически взаимодействующих комплексов с помощью стрептавидин-агарозы. Показано, что актинин 4 и его фрагмент 55 кДа присутствуют среди белков, взаимодействующих с последовательностью карра В, причем средство актинина 4 к консенсусу ниже, чем у р65-субъединицы. Кроме того, фрагмент 55 кДа актинина 4 обнаруживается в ДНК-белковых комплексах, не содержащих р65. Полученные данные позволяют предположить, что присутствие актинина 4 и его фрагмента 55 кДа в р65-содержащих комплексах связано с ингибированным состоянием NF-карраВ.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 7852.2006.4) и международного гранта Шведского института (Visby project).

НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ В ИНТЕРФАЗНОМ ЯДРЕ *AMOEBA PROTEUS*: КОНФОКАЛЬНО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ. © И. Е. Борисенко,¹ Ю. И. Подлтаева,² А. В. Гудков.² ¹С.-Петербургский государственный университет и ²Институт цитологии РАН.

Плоидность ядра *Ameba proteus* до сих пор остается загадкой. Отсутствие гаплофазы в жизненном цикле этих облигатно агамных организмов, с одной стороны, и малый размер их хромосом — с другой, не позволяют определить плоидность ни путем измерения количества ДНК в гаплоидном ядре, ни какими-либо методами цитологического карิโอтипирования. Число хромосом, наблюдаемое в митотических ядрах амеб, по разным источникам, варьирует от 50 до 1000. Клеточный цикл амебы имеет ряд особенностей, осложняющих использование определения содержания ДНК как меры плоидности: в цикле отсутствует фаза G₁, а сразу по окончании kariokinesis начинается синтетическая фаза (S), причем если в момент окончания kariokinesis количество ДНК условно обозначить за единицу, то к началу G₂ его количество в ядре может увеличиваться в 3.9 раза (так называемая гиперрепликация ядерной ДНК). В ходе G₂ часть ДНК элиминируется и в конечном итоге начинает приближаться к удвоенному (2n?). Обилие симбиотических микроорганизмов в цитоплазме и содержащихся в пищеварительных вакуолях тетрахимен, используемых в качестве корма для амеб, приводит к необходимости выделения ядра из клетки для проведения корректных количественных измерений, что делает невозможным измерение содержания ДНК в ходе митоза методом цитофлуориметрии. Возможно, что использование конфокальной микроскопии позволило бы произвести примерную оценку числа хромосом и приблизиться

к построению карิโอ типа. В качестве отработки такой методики нами была предпринята попытка применить конфокальную микроскопию для изучения структуры интерфазного хроматина в ядре амебы, а также для определения связи между гиперрепликацией ДНК и ее содержанием в ядрышках. Амеб фиксировали 4 % PFA в PBS с добавлением Tween-20 и окрашивали DAPI и пиронином Y. Препараты исследовали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SPE.

Внутри клетки интерфазное ядро может иметь различную форму — от правильной дисковидной до неправильной изогнутой с небольшими выростами ядерной оболочки. Однако при разрушении клетки детергентами и изоляции ядра оно принимает форму округлого диска. Диаметр ядра составляет 33 ± 4 мкм. Основная масса хроматина локализована в центре ядра, занимая область размером 22.0 ± 2.5 мкм. Хроматин представлен тесно прилегающими друг к другу гранулами размером от 1—2 до 5 мкм.

По периферии ядра располагается обедненный ДНК слой нуклеоплазмы шириной 5.4 ± 1.1 мкм. Относительная ширина этого слоя варьирует у разных особей. Окрашенные DAPI структуры в этом регионе представляют собой округлые образования размером 1—4 мкм. Если видимое нами окрашивание соответствует ДНК-содержащим компонентам, то, судя по интенсивности сигнала, плотность упаковки ДНК в них значительно ниже, чем в центральном хроматине. Однако не исключено, что видимый сигнал может быть обусловлен присутствием двухцепочечной РНК. В пользу этого свидетельствует тот факт, что окрашивание пиронином Y показало наличие РНК в периферическом слое нуклеоплазмы, причем ее пространственное распределение совпадает с образованиями, окрашенными DAPI. Кроме того, относительное содержание РНК в этих структурах значительно выше, чем ДНК. Сопоставляя эти данные с известной картиной ультраструктурной организации ядра амебы, мы приходим к выводу о том, что выявляемые нами содержащие нуклеиновые кислоты образования в периферической зоне карิโอплазмы являются ядрышками. Относительно низкое содержание ДНК в них позволяет усомниться в их роли в гиперрепликации ДНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-01003).

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА С-ПОЛИМОРФИЗМА ХРОМОСОМ ШОРСКОГО И РУССКОГО НАСЕЛЕНИЯ КУЗБАССА. © Е. А. Бражникова, В. Г. Дружинин. Кафедра генетики Кемеровского государственного университета, susie@bk.ru.

В работе исследованы 106 подростков в возрасте от 10 до 19 лет обоего пола (47 русских и 59 шорцев), проживающих в одном и том же районе Кемеровской обл. Поэтому экологическая обстановка для обеих национальных подгрупп считается одинаковой. В качестве экстремальных вариантов (ЭВ) гетерохроматиновых блоков хромосом принимали 1, 4 и 5 баллов по пятибалльной системе оценок, а также учитывали перичентрические инверсии хромосом 1, 9 и 16. Статистический анализ выполнен в среде пакета SAS 9.2. Критическое значение уровня статистической значимости $P = 0.05$. Взаимосвязь при-

знака «национальность» и цитогенетических признаков исследовалась путем анализа таблиц сопряженности (вычисление критерия Хи-квадрат, достигнутого уровня значимости P и показателя силы связи V —Крамера) и оценкой уравнений логистической регрессии.

Установлено, что среди шорцев 67.8 % детей являются носителями ЭВ гетерохроматина, тогда как среди русских — только 38.3 % ($P = 0.0024$; $V = 0.294$). Число вариантов qh^- и qh^+ гетерохроматина в обеих группах колебалось от 0 до 5 на одного подростка, при этом среди шорцев встречается большее количество человек с одним, двумя и тремя ЭВ в кариотипе. В хромосомах 1, 16 и Y в обеих группах не зарегистрировано ни одного случая значительного увеличения блока гетерохроматина (5 баллов). Наиболее варибельным (1—5 баллов) оказался гетерохроматиновый район хромосомы 9, что согласуется с данными литературы. У 19 (32.2 %) из 59 шорцев встречается по одному ЭВ в данной хромосоме; у 3 (5.08 %) шорцев оба гомолога несут ЭВ ($P = 0.0438$; $V = 0.2429$). У русских только 17.02 % детей имеет ЭВ в хромосоме 9, что значительно ниже ожидаемого числа. У 4 шорцев (6.78 %) и 1 русского (2.13 %) были зарегистрированы случаи частичной инверсии гетерохроматинового блока хромосомы 9. Также для шорцев установлена более высокая частота встречаемости варианта Yqh^+ (4 балла) по сравнению с русскими (16.13 и 4.55 % соответственно). У 44.68 % русских суммарное количество баллов по парам хромосом 1, 9 и 16 равно 13, что почти в 2 раза превышает ожидаемое значение. У шорцев наиболее часто (у 32.2 % детей) встречается суммарный балл, равный 12, что также превышает ожидаемое количество ($P = 0.0057$; $V = 0.45$).

Метод логистической регрессии показал, что при использовании 2—3 цитогенетических признаков (варианты qh в определенных хромосомах) перепроверка национальной принадлежности по уравнению логит-регрессии дает совпадение с фактической национальностью в 70—75% случаев, а в уравнениях логит-регрессии с 6—7 цитогенетическими предикторами этот показатель увеличивается до 91 %. Сравнение стандартизованных коэффициентов уравнений логит-регрессии показывает доминирование в различии сравниваемых национальностей таких признаков, как варианты qh в Y-хромосоме и количество ЭВ на кариотип человека. Можно заключить, что цитогенетический профиль шорской популяции характеризуется значительным (по сравнению с пришлым русским населением) количеством ЭВ С-гетерохроматина, среди которых в парах хромосом 1, 9 и 16 преобладают варианты qh^- , а в Y-хромосоме — qh^+ . Вероятно, это является следствием многовекового проживания шорской группы в относительной изоляции, способствующей накоплению определенных вариантов и сочетаний вариантов С-гетерохроматина в генофонде популяции. Данное исследование планируется продолжить путем увеличения объема выборки и использования иных необходимых методов многомерной биостатистики.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ТРАНСКРИПТОВ КОРОТКИХ ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ ДНК В ЯДРАХ РАСТУЩИХ ООЦИТОВ ПТИЦ ОТРЯДА GALLIFORMES. © Е. В. Василевская, А. В. Красикова. Лаборатория структуры и функции хромосом и кафедра цитологии и гистологии С.-Петербургского государственного университета, spbchromas@gmail.com.

Функциональное значение транскрипции сателлитных последовательностей ДНК в соматических и половых клетках является предметом интенсивных дискуссий. Ядра растущих ооцитов птиц, характеризующиеся гигантскими размерами и интенсивной транскрипцией не кодирующих белки последовательностей ДНК, представляют собой удобную модельную систему для анализа пространственной локализации транскриптов сателлитных повторов. С целью исследования распределения РНК сателлитных повторов с высоким уровнем детализации в работе впервые апробирован метод трехмерной флуоресцентной гибридизации *in situ* (3D-FISH) на интактных ядрах растущих ооцитов птиц отряда Galliformes. 3D-FISH проводили по протоколу ДНК/РНК-гибридизации, который не подразумевает денатурацию геномной ДНК ооцитов и, следовательно, позволяет максимально сохранить архитектуру гигантских ядер. В качестве зондов использовали флуоресцентно меченные олигонуклеотиды, что позволило снизить температуру гибридизации и исключить этап детекции гибридных молекул. Последующий 3D-анализ ядер и визуализацию гибридов меченым олигонуклеотид/РНК проводили при помощи инвертированного лазерного сканирующего конфокального микроскопа. В результате в ядрах ооцитов (зародышевых пузырьках) домашней курицы *Gallus gallus domesticus* и японского перепела *Coturnix coturnix japonica* охарактеризовано трехмерное распределение продуктов транскрипции короткого tandemного повтора ДНК PO41. На стадии роста ооцита наибольшая концентрация РНК повтора PO41 была выявлена в латеральных петлях хромосом типа ламповых щеток, где вновь синтезированные транскрипты локализовались в виде отчетливо различных поляризованных единиц РНП-матрикса. Сайты накопления транскриптов в ядре соответствовали основным местам локализации массивов повтора PO41 в кариотипе домашней курицы и японского перепела. Основываясь на полученных данных, мы можем с уверенностью утверждать, что внутриядерные домены, обогащенные РНК коротких сателлитных повторов, соответствуют транскрипционным единицам на латеральных петлях в прицентромерных и субтеломерных районах хромосом. На препаратах ядер были также обнаружены мелкие гранулы, которые веерообразно расходились от сайтов транскрипции повтора и имели более яркое окрашивание по сравнению с равномерным сигналом нуклеоплазмы. Эти гранулы представляют собой не связанные с хромосомами комплексы РНП-частиц, в состав которых входят недавно синтезированные транскрипты повторяющейся ДНК PO41. После проведения 3D-FISH на фрагментах яичников курицы и перепела помимо внутриядерной локализации транскрипты tandemного повтора PO41 были выявлены и в цитоплазме, где они, по-видимому, могут процессироваться или запасаться. На более поздних стадиях созревания ооцита в ядрах, содержащих в целом транскрипционно неактивные хромосомы, на поверхности некоторых конденсированных бивалентов были также обнаружены места скопления транскриптов повтора PO41. Эти данные могут свидетельствовать о продолжающейся транскрипции коротких прицентромерных и субтеломерных повторов ДНК на стадии кариосферы в ядрах созревающих ооцитов птиц.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (ГК № П1367) и при технической поддерж-

ке ЦКП «ХРОМАС» С.-Петербургского государственного университета.

ДИНАМИКА ВЗАИМОРАСПОЛОЖЕНИЯ ХРОМОСОМ В ЯДРАХ ТРОФОЦИТОВ У НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ DIPTERA ПРИ ВИДООБРАЗОВАНИИ.
© И. Э. Вассерлауф, К. Е. Усов, Т. В. Ананьина, В. Н. Стегний. Научно-исследовательский институт биологии и биофизики при Томском государственном университете, gene@res.tsu.ru.

Ориентация хромосом в пространстве ядра у эукариот играет важную роль в экспрессии генов, в сегрегации хромосом в процессе клеточного деления (Стегний, 1979; Глазков, 1999; Marshall, Sedat, 1999; Sadoni, Langer, 1999; Cremer, Cremer, 2001). Для интерфазного ядра характерна динамичность хроматина (De Boni, Mintz, 1986; Abney et al., 1997; Marshall et al., 1997; Csink, Henikoff, 1998), при этом хромосомы сохраняют свою территориальность и взаимное расположение (Croft et al., 1999; Cremer, Cremer, 2001; Karen et al., 2007). По своей функциональной значимости ядра с политенными хромосомами большинства двукрылых насекомых являются хорошей моделью интерфазных для изучения функциональной, структурной и пространственной организации хромосом. Изучение *Anopheles* показало, что пространственная организация политенных хромосом в ядрах трофоцитов яичников имеет тканевую и видовую специфику. Архитектоника хромосом ядер трофоцитов яичников может являться таксономическим признаком. Такая реорганизация архитектуры хромосом ядер трофоцитов яичников, сопряженная с видообразованием, была названа системной мутацией (Стегний, 1979, 1993).

Исследования архитектуры ядер на протяжении эндомитотических циклов и изучение феномена реорганизации ядра в генеративной системе клеток (системной мутации) при видообразовании у ряда представителей двукрылых насекомых являются актуальными для понимания механизмов реорганизации ядра в процессе сальтационного видообразования.

Нами был проведен анализ ориентации первичных политенных хромосом в ядрах трофоцитов яичников у *Calliphora erythrocephala* (Diptera: Calliphoridae), близкородственных видов подгруппы *melanogaster* и видов группы *virilis* рода *Drosophila*. У дрозофил обнаружены четыре типа организации ядра: 1) с локальным хромоцентром, 2) с диффузным хромоцентром, 3) с отсутствием визуального хромоцентра, 4) с прикреплениями хромосом к ядерной оболочке. Эволюционные преобразования взаиморасположения хромосом в ядрах трофоцитов у видов происходили по схеме: от локального хромоцентра у филогенетически исходных видов к его частичному, а затем и к полному исчезновению у производных видов, при этом хромосомы рассредоточены в ядре и образуют связи с оболочкой ядра у ряда видов. На основании исследований ориентации хромосом в ядрах трофоцитов уточнены филогенетические отношения между видами в подгруппе *melanogaster* и в группе *virilis*. Показано, что реорганизация хромосомного аппарата при видообразовании у видов группы *virilis* и подгруппы видов *melanogaster* имеет сходный характер. При видообразовании произошло перераспределение хромоцентрального гетерохроматина по плечам хромосом, что было выявлено нами с помощью FISH-гибридизации ДНК последовательностей хромо-

тра *D. oreana* на хромосомы трофоцитов у видов подгруппы *melanogaster*. Вероятно, что уменьшение количества гетерохроматина или перераспределение его по плечам хромосом в прицентромерных районах приводило к изменению структуры хромоцентра: к образованию диффузного хромоцентра, а затем к его визуальному исчезновению, при этом хромосомы рассредотачиваются в пространстве ядра либо за счет прицентромерного β-гетерохроматина контактируют с оболочкой ядра и имеют видоспецифичное место прикрепления на оболочке ядра.

Полученные нами данные позволяют предположить, что выявленное сходство в параметрах видоспецифичности и в реорганизации хромосом в пространстве ядер генеративной системы клеток при видообразовании у малярийных комаров и дрозофил, возможно, широко распространено среди двукрылых насекомых и может иметь общебиологическую значимость.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 10-04-01059 и 2.1.1/774).

СТРУКТУРА ХРОМАТИНА НЕАКТИВНОЙ X-ХРОМОСОМЫ У ОБЫКНОВЕННЫХ ПОЛЕВОК. © Е. А. Васюкова, А. И. Шевченко, С. В. Павлова, Е. В. Деметьева, Е. В. Григорьева, С. М. Закиян. Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск.

У млекопитающих существуют три формы инактивации X-хромосомы — мейотическая, импринтированная и случайная. Мейотическая инактивация происходит в сперматогенезе у самцов на стадии пахитены в мейозе, когда обе половые хромосомы становятся транскрипционно неактивными. Транскрипционный сайленсинг половых хромосом частично сохраняется и на постмейотических стадиях. На предимплантационных стадиях развития у самок имеет место импринтированная инактивация, когда инактивации подвергается X-хромосома, унаследованная от отца. На стадии бластоцисты в клетках эпибласти происходит ее реактивация, после чего выбор неактивной X-хромосомы происходит случайным образом. Было высказано предположение о том, что в результате мейотической инактивации X-хромосома сохраняет маркеры неактивного хроматина в зиготе и поэтому предетерминирована в отношении инактивации.

В данной работе на примере полевки *Microtus rossiae-meridionalis* был изучен паттерн распределения ряда модификаций гистонов в пределах неактивной X-хромосомы. Так, было показано, что в половом тельце, а также на ранних стадиях процесса импринтированной инактивации структура неактивной X-хромосомы представлена единой системой сайленсинга. Неактивное состояние X-хромосомы на данных этапах развития обеспечивают система HPI/H3K9me3, а также убиквитинированный гистон H2A. Следует отметить, что uH2A, HPI и H3K9me3 равномерно распределены вдоль всей неактивной X-хромосомы и выявляются как в блоке гетерохроматина, так и в эухроматиновой части, однако отсутствуют в блоке гетерохроматина активной X-хромосомы. На более поздних стадиях процесса импринтированной инактивации подключается PRC2-зависимая система сайленсинга (т. е. происходит триметилирование гистона H3 по лизину K27), что обеспечивает формирование двух типов гетеро-

хроматина. При случайной инактивации X-хромосомы в эмбриональных фибробластах *M. rossiaemeridionalis*, так же как и при импринтированной инактивации на более поздних стадиях предимплантационного развития, неактивную структуру X-хромосомы обеспечивают две системы сайленсинга: triMeH3K9/HP1 и triMeH3K27/uH2A, ассоциированные с G-позитивными и G-негативными бэндами соответственно.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МЕЖДИСКОВЫХ РАЙОНОВ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ *DROSOPHILA MELANOGASTER*. © Т. Ю. Ватоллина, С. А. Демаков, В. Ф. Семешин, И. В. Макунин, В. Н. Бабенко, И. Ф. Жимулев. Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, demakov@mcb.nsc.ru.

С помощью электронно-микроскопического (ЭМ) картирования политенных хромосом пяти трансгенных линий мух было показано, что встройки Р-транспозонов в этих линиях произошли в районы междисков. Известная молекулярная организация встроенных конструкций позволила клонировать ДНК этих районов и, таким образом, существенно увеличить количество междисков, имеющих точную привязку к молекулярно-генетическим данным. Анализ последовательностей ДНК 13 клонированных в настоящее время междисков показал, что во всех случаях транспозоны встроились в некодирующие участки генома дрозофилы: основная часть этих районов (10/13) является межгенными промежутками, ограниченными 5'- и (или) 3'-концами генов, в районах 3A и 87C встройки произошли в экзоны генов, и лишь в одном случае встройка в районе 1A обнаружена в интроне гена. Известные гены в районах встроек различаются по функциям и особенностям экспрессии в онтогенезе. Анализ распределения значительного числа сайтов встраивания Р-элементов, имеющих точную привязку к геномной ДНК, в междисках и соседних с ними протяженных районах показал, что мишенями преимущественного встраивания Р-транспозонов являются междиски. Исследования организации хроматина в нативных междисках 3A5/A6, 3C6/C7, 60E7/E8-9, 61C7/C8, 85D9/D10 и 87C8/C9 методом картирования ДНКазы I гиперчувствительных сайтов (DHS) показали, что эти районы обогащены DHS размером 50—100 п. н. и во всех случаях места локализации транспозонов ассоциированы с участками, содержащими DHS. На примере одного из междисков выявлено сходство локализации DHS в ядрах эмбрионов и личинок третьего возраста. Используя данные проекта modENCODE по локализации хроматиновых белков на геномном уровне в культурах клеток дрозофилы, мы с высокой точностью картировали ряд белков в пределах изучаемых нами ДНК междисков. Было показано, что практически все последовательности ДНК, соответствующие междискам в хромосомах слюнных желез, в культуре клеток содержат белки, характерные для хроматина с открытой конформацией (RNAPo-IIIa, ацетилированные формы гистонов H3 и H4, некоторые моно-, ди- и триметилированные формы гистона H4), белки хроматин модифицирующих комплексов, инсуляторные белки и белки регуляции транскрипции. Большинство из этих белков имеет междиск-специфичный рисунок распределения на политенных хромосомах слюнных желез. Полученные данные указывают на сходство организации хроматина междисков в разных типах клеток,

что позволяет предполагать участие этих районов в общеклеточных процессах формирования и поддержания функциональной архитектуры хромосом.

ЦИТОСТАТИЧЕСКИЙ И АПОПТОЗИНДУЦИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТЫ НАНОКОМПОЗИТОВ НА ОСНОВЕ КРИСТАЛЛОВ КРЕМНИЯ И ФУЛЛЕРЕНОВОЙ ФАЗЫ НА ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ NT-1080. © Т. О. Волкова, О. В. Курмышкина, Н. Н. Немова. Кафедра молекулярной биологии, биологической и органической химии Петрозаводского государственного университета.

Проблема формирования наночастиц для направленной доставки и прицельного воздействия на биологические мишени решается путем использования нанопористых полупроводников и их наноконструктов с молекулами фуллеренов C₆₀ и C₇₀, обеспечивающих высокоэффективную генерацию возбужденных состояний синглетного кислорода. Синглетный кислород и ряд других кислородсодержащих радикальных молекул играют важную роль в регуляции процессов жизнедеятельности организмов. Кроме того, показано, что синглетный кислород может быть использован как мощный оксидант биомолекул для лечения онкопатологий (метод фотодинамической терапии). При этом нанореакторы являются наиболее эффективным способом формирования синглетного кислорода в локальной области злокачественных новообразований.

Было изучено цитостатическое и апоптозиндуцирующее действие наноконструкта кристаллов кремния с адсорбированными молекулами фуллерена C₆₀ на клетки фибросаркомы человека NT-1080. Наноконструкт создан на кафедре физики твердого тела Петрозаводского государственного университета. Там же получены результаты, касающиеся особенностей переноса энергии в наноструктурированный кремний—фуллерены и позволяющие сделать вывод об эффективной генерации синглетного кислорода в данном наноконструкте. Нами установлено, что разработанный наноконструкт обладает по отношению к клеткам NT-1080 выраженным цитостатическим действием: к 5-м сут экспозиции количество жизнеспособных опухолевых клеток в культуре составляло всего 10—12 %, тогда как определяемый показатель клеток, обработанных только нанокристаллами кремния, находился на уровне 32—35 %. Культивирование клеток с чистыми фуллеренами снижало их жизнеспособность до 60—63 %. Жизнеспособность необработанных клеток в культурах была порядка 95—97 %. С использованием специфических субстратов каспаз показано, что в клетках, обработанных наноконструктом, имеет место резкое повышение активности каспаз 8 и 9 с последующей фрагментацией ДНК. В клетках, культивируемых только с нанокристаллами кремния или фуллереном C₆₀, также наблюдалась индукция апоптоза, но процесс протекал менее выраженно и с задержкой во времени. Все культуры после внесения реагентов в течение 1 ч подвергались воздействию видимого света. Таким образом, создание подобных фотосенсибилизаторов представляется весьма перспективным подходом к разработке препаратов нового поколения для фотодинамической терапии опухолей.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта НШ-306.2008.4.

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТЕЙ КАСПАЗ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ПРИ ОБРАБОТКЕ ИНДУКТОРАМИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ. © Т. О. Волкова, И. Е. Малышева, О. В. Курмышкина, Н. Н. Немова. Кафедра молекулярной биологии, биологической и органической химии Петрозаводского государственного университета.

Поиск новых внутриклеточных мишеней действия фармакологически активных агентов является одной из центральных проблем современной биологии и медицины. Наиболее перспективными среди молекул-мишеней рассматриваются ферменты, играющие центральную роль в передаче сигналов при индукции дифференцировки и апоптоза. Одними из таких регуляторных ферментов являются клеточные каспазы. В представленном исследовании изучено изменение экспрессии генов каспаз 3, 6 и 9, а также активности ферментов в эритромиелолойкозных клетках K562 при обработке индукторами эритроидной (цитозинарабинозид и адриамицин) и миелоцитарной (дексаметазон и форбол-12-миристан-13-ацетат — ФМА) дифференцировки. Параллельно в культурах оценена степень индукции апоптоза.

Дифференцировку клеток определяли непрямой иммунофлуоресценцией с использованием моноклональных антител (CD11c, CD14 и гликофорин А — GrA), меченых FITC. Экспрессию генов оценивали методом ПЦР в режиме реального времени. Флуорофор — SYBR Green. Амплификацию проводили в iQ5, используя наборы, совмещенные с обратной транскрипцией iScript One-Step RT-PCR Kit. Изменение активности каспаз проводили согласно прилагаемой инструкции (BioRad, США) с использованием субстратов, меченных AFC. Субстраты для каспаз: 3 — DEVD (Asp-Glu-Val-Asp), 6 — VEID (Val-Glu-Phe-Asp), 9 — LEHD (Leu-Glu-His-Asp). Фрагментацию ДНК (апоптоз) регистрировали электрофорезом в 2%-ном геле агарозы.

Обработка клеток K562 2 мМ цитозинарабинозида или 1 мМ адриамицина в течение 2 сут приводила к усилению экспрессии гена каспазы 3 и активности белка. Количество GrA-положительных клеток в культурах возрастало в 3.2—3.5 раза. Апоптоз регистрировался только к 4-м сут на фоне предварительного повышения активности каспазы 9. Дexamетазон (5 мкМ) и ФМА (100 нМ) повышали количество CD11c- и CD14-положительных клеток к 4-м сут обработки. В культурах с ФМА наблюдалось увеличение экспрессии генов каспаз 3, 6 и активности ферментов, апоптоза не регистрировалось. В клетках, инкубированных с дексаметазоном, индуцировались каспазы 3, 6 и 9 и выраженная фрагментация ДНК. При совместном внесении в культуры комбинации ФМА + цитозинарабинозид (или адриамицин) наблюдалось перераспределение активностей каспаз по сравнению с ФМА-обработанными клетками: активность каспазы 6 снижалась, каспазы 3 и 9 резко возрастала, индуцировался апоптоз.

В работе обсуждается, что при индукции различных путей дифференцировки клеток активируются разные каскады каспаз, апоптоза при этом может не наблюдаться. Обработка клеток комбинацией индукторов приводит к перераспределению функциональной активности каспаз. Данный факт необходимо учитывать при разработке нового поколения антиопухолевых препаратов, специфически ингибирующих каспазы.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта НШ-306.2008.4.

РЕАКЦИЯ ОБМЕНА НИТЕЙ ДНК МЕЖДУ КОРОТКИМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДАМИ С УЧАСТИЕМ БЕЛКОВ СИСТЕМЫ ГОМОЛОГИЧНОЙ РЕКОМБИНАЦИИ У ЧЕЛОВЕКА. © А. А. Володин, Т. Н. Бочарова, Е. А. Смирнова. Институт молекулярной генетики РАН, Москва.

Гомологичная рекомбинация (ГР) является одним из фундаментальных генетических процессов обеспечивающим репарацию двухнитевых разрывов ДНК. У подавляющего большинства эукариотических организмов ГР лежит также в основе мейоза, обеспечивая сегрегацию гомологичных хромосом и перетасовку генетического материала между ними. Основная стадия ГР — реакция обмена нитей ДНК — катализируется специальными белками рекомбиназами. В мейозе одновременно работает несколько таких белков, наиболее изученными из которых являются белки Rad51 и Dmc1 и их аналоги. Эти белки являются ортологами бактериальной рекомбиназы — белка RecA из *E. coli*. Причины существования в одном организме нескольких разных рекомбиназ и распределение функций между ними в мейозе остаются неизвестными.

Установлено также участие в мейозе и других белков со сходной активностью, но не принадлежащих к классу RecA-подобных. Одним из них является белок Hop2, который действует на ранних стадиях мейоза и необходим для специфического взаимодействия гомологичных хромосом. Молекулярные механизмы его действия также неизвестны.

Ранее мы показали, что короткие флуоресцентно меченные олигонуклеотиды могут быть использованы как субстраты рекомбиназ, в частности для изучения реакции обмена нитей ДНК с участием рекомбиназ человека (Vlodin et al. J. Biol. Chem. 2009, 284: 1495). В настоящей работе мы демонстрируем способность белка Hop2 катализировать обмен нитей между такими субстратами. Механизм такого обмена существенно отличается от механизмов реакций с участием белков Rad51 и Dmc1, охарактеризованных нами ранее. В частности, реакция с участием Hop2 не требует нуклеотидного кофактора и присутствия ионов двухвалентных металлов.

Наиболее существенной особенностью реакции обмена нитей в присутствии белка Hop2 является ее высокая чувствительность к нарушениям гомологии между молекулами ДНК, участвующими в обмене. Как мы показали ранее, в реакциях с участием белка RecA из *E. coli* и в особенности белков Rad51 и Dmc1 человека чувствительность к нарушениям гомологии между партнерами реакции значительно снижена по сравнению со случаем спонтанного обмена нитей между свободными молекулами ДНК при повышенной температуре. В отличие от случая RecA-подобных рекомбиназ реакция обмена нитей в присутствии белка Hop2 характеризуется чувствительностью к нарушению гомологии, сравнимой с таковой для случая спонтанного обмена между олигонуклеотидами.

Полученные данные указывают на то, что на стадии распознавания гомологии между хромосомами при мейозе белок Hop2 может действовать эффективнее, чем «классические» рекомбиназы — белки Rad51 и Dmc1. В более широком смысле наши наблюдения позволяют поставить вопрос о существовании наряду с RecA-подобными нового класса (классов) рекомбиназ, различающихся

ся по чувствительности к нарушению гомологии между ДНК, вовлеченными в ГР, и о роли рекомбиназ разных классов в мейозе и других процессах, связанных с метаболизмом ДНК.

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР TRF2 УЧАСТВУЕТ В КОМПАКТИЗАЦИИ ХРОМАТИНА У *DROSOPHILA MELANOGASTER*. © Ю. Е. Воронцова,¹ Е. А. Модестова,² О. Б. Симонова.¹ ¹Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН и ²Институт биологии гена РАН, Москва.

У дрозофилы один из генов комплекса *lawc/Trf2* (*leg-arista-wing complex/TBP-related factor 2*) кодирует альтернативный фактор базовой транскрипции, гомологичный белку TRF2 позвоночных животных и человека, и принадлежит консервативному семейству генов *Tbp* (*TATA binding protein*). Нами была получена большая коллекция линий дрозофилы, мутантных по *lawc/Trf2*.

Было замечено, что у ряда *lawc*-мутантов с пониженной экспрессией белка TRF2 частота нерасхождения X-хромосомы (30.7 %) примерно в 20 раз превышала контрольную (1.4 %). В поисках причин нерасхождения хромосом мы провели цитологический анализ ядра ооцита поздних и ранних стадий развития. Оказалось, что у мутантов нарушаются структура хроматина прицентромерных районов, компактизация и спаривание гомологов, идет расщепление хромоцентра.

Среди аллелей гена *lawc/Trf2* есть мутации, приводящие к стерильности самцов и самок. Анализ клеток репродуктивной системы стерильных самцов показал декомпактизацию хроматина у сперматоцитов I порядка, в результате чего стадия сперматоцита I порядка затягивается, мейотические формы практически отсутствуют. Зафиксированы случаи формирования полиплоидных клеток из-за нарушения расхождения хромосом. Исследуя репродуктивную систему стерильных самок методами флуоресцентного окрашивания, мы обнаружили много нарушений, связанных с контролем циклического деления стволовых соматических и герминативных клеток и с плоидностью ооцитов и трофоцитов.

Анализ распределения белка TRF2 на политенных хромосомах слюнных желез личинок выявил его локализацию как в эухроматине, так и в области хромоцентра.

Мы считаем, что дезорганизация компактизации хроматина и хромоцентра является причиной аномальной сегрегации хромосом, возможно из-за нарушения прикрепления нитей веретена деления к кинетохору. Это приводит к гибели клеток и дефициту сперматозоидов у мутантных самцов и нарушает формирование и созревание ооцита у мутантных самок.

Литературные данные сообщают о том, что исследования на клеточных культурах обнаружили TRF2 в составе макромолекулярного нуклеосома-ремодулирующего комплекса NURF (NUcleosome Remodelling Factor), который связан с активацией хроматина. Данные, полученные нами на дрозофиле у мутантов с пониженной экспрессией TRF2, подтверждают выдвинутую другими авторами гипотезу о том, что этот белок может не только участвовать в активации транскрипции, но и выполнять структурные функции в организации хроматина. Локализация TRF2 в хромоцентре и высокая частота нерасхождения хромосом, вызванная нарушением структуры их перичентриче-

ских районов, позволяют предположить, что TRF2, возможно, участвует в контроле эпигенетической регуляции формирования кинетохоров.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ САТЕЛЛИТНОЙ ДНК И БЕЛКОВ ЯДЕРНОГО МАТРИКСА В ОДНО- И ДВУХКЛЕТОЧНЫХ ЗАРОДЫШАХ МЫШИ. © Е. В. Гаврилова,¹ И. С. Кузнецова, Н. И. Енукашвили, О. И. Подгорная. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ¹shelbys@mail.ru.

При формировании мужского и женского пронуклеусов в них образуются так называемые предшественники ядрышка, или проядрышки (ПЯ). ПЯ видны как сферические оптически плотные структуры размером от 2 до 8 мкм, по периферии интенсивно окрашиваемые ДНК-специфичными красителями. ПЯ являются предшественниками не только ядрышек, но и хромоцентров. Формирование прохромоцентров совпадает с началом активации эмбрионального генома и происходит с середины 2-клеточной стадии. В настоящей работе сравнили позиции трех сателлитных ДНК (сатДНК) и белков у 1- и 2-клеточных зародышей при щадящей фиксации параформальдегидом (ПФА) и стандартной фиксации метанол-уксусной кислотой (МУ), используя флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH), модификацию иммуно-FISH и иммунофлуоресценцию. FISH с сатДНК показала, что при фиксации ПФА сатДНК окружает ПЯ в соответствии с литературными данными, при фиксации МУ происходит перераспределение сатДНК так, что она покрывает площадь ПЯ. Независимо от метода фиксации разные сатДНК занимают разные компартменты: перичентромерная сатДНК окружает ПЯ, тогда как центромерная расположена отдельными точками. СатДНК-связывающие белки (субъединицы когезина, РНК-хеликаза р68 и Saf-A) также располагаются по периферии ПЯ или перераспределяются вслед за сатДНК в зависимости от фиксации. Предположение о том, что фибриллярный материал ПЯ может состоять из белков ядерного матрикса не подтвердилось: тестированные белки (топоизомераза II, ламин В, актин и матрикс) расположены в ядре безотносительно к ПЯ или окружают их. В соответствии со временем начала образования хромоцентров на 2-клеточной стадии можно обнаружить ПЯ, содержащие гораздо меньшее количество сатДНК по сравнению с 1-клеточной стадией. Однако обработка оксадаевой кислотой, которая приводит к преждевременной конденсации хромосом, позволила обнаружить характерную картину «тележного колеса», т. е. ПЯ с прикрепленными к ним хромосомами как на 1-, так и на 2-клеточной стадиях. Маркер гетерохроматина белок HP1 на 2-клеточной стадии не покрывает гранулы мажорной сатДНК, а прилежит к ним. Белковый состав прохромоцентров, которые, вероятно, начинают образовываться на основе ПЯ, еще не соответствует классическому составу соматических хромоцентров. Но ПЯ безусловно являются структурами, организующими хромосомы в пронуклеусах и на 2-клеточной стадии.

МИКРОРНК КАК ИНГИБИТОРЫ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК. © В. Галицкий. Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины.

МикроРНК (miRNA) способны подавлять экспрессию стадийспецифических генов. В частности, при помощи

программы TargetScan был выявлен в 3'-UTR-участке мРНК генов факторов Bcl6 и MITF, отвечающих за стадию зрелых В-лимфоцитов, высококонсервативный сайт микроРНК miR-181 типа 7mer-1A. Поэтому условием перехода клетки на указанную стадию является репрессия гена данной miRNA. Также был выявлен высококонсервативный сайт miR-223 типа 7mer-m8 в 3'-UTR-участке мРНК гена *prdm1*, кодирующего ключевой фактор стадии плазмочитов — белок Blimp1. Известно, что и другие miRNA препятствуют дифференцировке клеток.

Гены miRNA, являясь производными мобильных элементов генома класса MITE (miniature inverted-repeat transposable elements), в процессе эволюции возникали, вероятно, из отдельных копий транспозонов, транскрипты которых, распознаваемые и процессируемые эндонуклеазами Drosha и Dicer благодаря формированию шпилек из-за наличия инвертированных повторов, клетка использовала для репрессии остальных копий транспозонов при помощи как посттранскрипционного сайленсинга, так и, вероятно, РНК-зависимого метилирования ДНК (Halutskiy, 2007, 2008). Благодаря последнему экспрессируемый в стволовых клетках набор miRNA способен восстанавливать профиль эпигенетических маркеров, свойственный данным клеткам, посредством чего достигается минимально возможный уровень активности транспозонов. Вероятно, гены стволового набора miRNA реактивируются также при клонировании организмов и принимают участие в перепрограммировании дифференцированных клеток в стволовые.

В ходе эволюции новые модули генов (группы генов, экспрессия которых поддерживается положительной обратной связью), отвечающие за новые направления и этапы дифференцировки клеток, возникали, вероятно, вследствие встраивания сайтов транскрипционных факторов в регуляторные области генов. А так как образование новых генов и перестройки регуляторных участков происходили, скорее всего, благодаря транспозонам, присутствие их последовательностей в составе стадийспецифических генов выглядит вполне закономерным. Данное предположение подтверждается, в частности, тем, что сайты отдельных классов транскрипционных факторов и сегодня являются инвертированными повторами. Таким образом, miRNA, присутствующие в незрелых клетках, репрессируют отвечающие за дальнейшие этапы созревания гены, так как те содержат последовательности, сходные с мобильными элементами генома.

Процесс дифференцировки требует репрессии генов данных miRNA, из-за чего клетки со временем теряют эпигенетические маркеры. Вероятно, с возрастом все большее количество клеток организма достигает порога реактивации дремлющих мобильных элементов вследствие критического деметилирования ДНК. Вызываемые активизировавшимися транспозонами перестройки и повреждения ДНК инициируют, с одной стороны, апоптоз большинства данных клеток (что и предопределяет старение как биологическое явление), а с другой — могут стать причиной активизации в отдельных клетках генов miRNA. Последние кроме подавления дальнейшей специализации могут вызывать изменение профиля эпигенетических маркеров, способствуя активизации онкогенов и препятствуя экспрессии генов-онкосупрессоров. Поскольку реактивация всего стволового набора miRNA в данном случае не происходит, деятельность транспозонов не прекращается, геном остается нестабильным, в результате чего трансформирующиеся клетки могут накапливать осталь-

ные опухолевые признаки. Также деметилирование ДНК и дерепрессия дремлющих мобильных элементов генома должны ускоряться в случае нарушения связей между хроматином и белками ядерной ламина, в частности в случае прогерии Хатчинсона—Гилфорда.

РОЗЕТОЧНАЯ МОДЕЛЬ ОРГАНИЗАЦИИ ИНТЕРФАЗНОЙ ХРОМОСОМЫ (СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ). © М. В. Глазков. Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, mvglazkov@yandex.ru.

Розеточные структуры впервые обнаружены на электронно-микроскопических препаратах лишенных гистонов хромосом. Большую роль в обоснования реальности их существования сыграли Comings и Okada. Они же впервые высказали предположение о том, что розеткоподобная организация характерна для гетерохроматина, содержащего сателлитную ДНК. Однако сомнения в реальности существования этих хромосомных субструктур остаются до сих пор. Основным аргументом при этом служат данные о том, что «очищенная» ДНК может «самопроизвольно» складываться в розеткоподобные структуры.

Во многих электронно-микроскопических исследованиях в составе интерфазных, метафазных и мейотических хромосом животных и растений выявлены глобулярные элементы диаметром около 100 нм. Нуклеазоустойчивые структуры интерфазных хромосом животных также представлены субструктурами сходного размера и содержат фрагменты ДНК длиной 20—50 т. п. н. Эти субструктуры включают в свой состав хроматин транскрипционнонеактивных генов. Деконденсация выделенных глобул 100 нм осуществляется через ряд этапов: глобулы 100 нм — розеткоподобные структуры — фибриллы 30 нм хроматина. На электронно-микроскопических препаратах лишенных гистонов хромосом можно видеть петельные структуры (средний размер 26 т. п. н.), на «вершине» которых идет транскрипция, и петельные структуры небольшого размера (до 5 т. п. н.), образующие розеткоподобные структуры. Все эти данные свидетельствуют о том, что розеткоподобные структуры являются способом организации транскрипционнонеактивных участков хроматина (генома).

Предложена модель организации интерфазной хромосомы, учитывающая розеточный уровень. Согласно этой модели, в интерфазной хромосоме имеются два типа «структурных» участков. Первый обеспечивает прикрепление хромосомы к ядерной оболочке, второй — компактизацию ядерной ДНК в виде петель небольшого размера, формирующих розеткоподобные структуры (содержат транскрипционнонеактивные участки генома). «Структурные» участки интерфазных хромосом мыши клонированы, секвенированы и исследована их первичная нуклеотидная последовательность. Исследована специфичность взаимодействия этих «структурных» участков с ядерной оболочкой и с белковыми сердцевинами розеткоподобных структур. В составе белковой сердцевины розеток выявлена ДНК-топоизомераза II.

Компьютерное моделирование петельной организации хромосом растений, животных и человека свидетельствует о том, что и белкокодирующие (гены), и белкокодирующие (сателлитная ДНК, LINE и SINE) участки генома могут быть компактизованы по одному механизму (при участии «гомологичных» треков полипуринов/поли-

пиримидинов длиной 10—11 п. н., образующих 3-цепочечные структуры ДНК) в виде серии петель небольшого размера. В ряде случаев (кодирующие белок нуклеотидные последовательности и сателлитная ДНК) наблюдается сблоченность в линейном расположении «гомологичных» треков, что приводит к образованию розеткоподобных структур. Возможность образования 3-цепочечных структур ДНК полипуриновыми/полипиримидиновыми треками внутри гена α_1 -антитрипсина человека показана нами в системе *in vitro*.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований президиума РАН «Биологическое разнообразие», подпрограммы «Генофонды и генетическое разнообразие».

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМЕРА ПОЛИАЛЛИЛАМИНА НА СТРУКТУРУ КАРИОТИПА ФИБРОБЛАСТОВ КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА ЛИНИИ CHL V-79 RJK.
© Т. М. Гринчук,¹ Л. Л. Алексеенко,¹ А. П. Домнина,¹ М. А. Шылина,¹ Д. С. Малыгин,¹ В. П. Иванова.² ¹Институт цитологии РАН и ²Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург.

Ранее на фибробластах китайского хомячка линии CHL V-79 RJK и ее терморезистентных вариантах нами было показано, что синтетический поликатион полиаллиламин (ПАА) при кратковременной (1.0—1.5 ч) обработке клеток в концентрации 100 мкг/мл обладает цитотоксическим действием.

Задачей настоящей работы являлось изучение степени стабильности генетического аппарата выживших после инкубации в присутствии ПАА клеток на уровне кариотипа. С этой целью был проведен сравнительный анализ дифференциально окрашенных на G-диски метафазных хромосом разнотипных по своим биологическим характеристикам клеточных популяций CHL V-79 RJK: клеток исходной линии (вариант 1), клеток, длительное время культивировавшихся при повышенной (40 °C) температуре (вариант 2), и клеток, отселектированных на устойчивость к агенту группы множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) бромистому этидию (БЭ) — сублинии Vebr-5 (вариант 3). ПАА добавляли в культуру клеток за 1 сут до приготовления цитологических препаратов. После 1-часовой инкубации ПАА отмывали и продолжали культивировать клетки в стандартных условиях. Для накопления метафазных пластинок использовали 0.04%-ный раствор колхицина, в качестве гипотонического раствора — 0.56%-ный KCl. Для каждого варианта детально проанализировано не менее 20 метафазных пластинок.

Установлено, что структура кариотипа клеток первых двух вариантов после их кратковременной инкубации в присутствии ПАА в концентрации 100 мкг/мл оставалась стабильной, сохраняя особенности исходных сублиний. Кариотип клеток варианта 3 после инкубации с ПАА по сравнению с контрольными клетками характеризовался структурной нестабильностью. Известно, что структура хромосом резистентных к БЭ клеток (Vebr-5, устойчивость к БЭ в концентрации 5 мкг/мл), использованных в настоящей работе в качестве объекта исследования, относительно постоянна, исключение составляет только одна хромосома (Z6), производная хромосомы 1, короткое пле-

чо которой (локус 1q26) в отличие от клеток, чувствительных к БЭ, маркировано гомогенно окрашенной областью (ГОО), трактуемой как морфологическое проявление амплификации гена(ов) *mdr*. Существенно, что селекция клеток Vebr-5 на устойчивость к БЭ в более высокой концентрации (10 мкг/мл, сублиния Vebr-10) приводила к вариабельности длины ГОО и преобладанию клеток с большей длиной ГОО, нежели в клетках Vebr-5. Увеличение длины ГОО в клетках Vebr-10 сопровождалось усилением экспрессии гена(ов) *mdr*. Краткосрочная (1 ч) инкубация клеток Vebr-5 (вариант 3) в присутствии ПАА индуцировала увеличение размера ГОО (в 2—4 раза) в локусе 1q26, подобно тому как это наблюдалось в клетках Vebr-10. К другим показателям нестабильности структуры кариотипа клеток Vebr-5, возникшим под воздействием ПАА, нужно отнести усиление в этих клетках анеуплоидии, увеличение частоты встречаемости полиплоидных клеток и клеток, имеющих атипичные, случайным образом перестроенные хромосомы. В связи с тем что накопление в популяции клеток с аналогичными аномалиями кариотипа связывают с нарушением механизма прохождения клетками митоза и цитокенеза, можно предположить, что ПАА уже при краткосрочном воздействии на клетки с МЛУ способен повышать их устойчивость к цитостатикам. Высказывается предположение о том, что данный поликатион может быть отнесен к числу агентов группы МЛУ.

КАРТИРОВАНИЕ ПРИЦЕНТРОМЕРНОГО ГЕТЕРОХРОМАТИНА *DROSOPHILA MELANOGASTER* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ ДВОЙНЫХ МУТАНТОВ *SuUR Su(var)3-9⁰⁶*. © О. Демасова,¹ Л. В. Болдырева,¹ Е. Н. Андреева,¹ Р. Dimitri,² А. Vil-lasante,³ R. Hoskins,⁴ G. Karpen,⁴ И. Ф. Жимулев.¹ ¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; ²Universita 'La Sapienza', Roma, Italy; ³Centro de Biologia Molecular 'Severo Ochoa', Madrid, Spain; ⁴Life Sciences Division, Lawrence Berkeley National Laboratory Berkeley, California, USA, zhimulev@mbs.nsc.ru.

Несмотря на прогресс в картировании и сборке отсеквенированных фрагментов прицентромерного гетерохроматина (ПГХ) *Drosophila melanogaster* в единую последовательность, разработка обобщенной карты всего гетерохроматина в рамках Геномного Гетерохроматинового Дрозофилинового Проекта (GHDP) остается актуальной задачей. Работы по картированию гетерохроматина с использованием компьютерных методов очень затруднены вследствие его насыщенности повторенными последовательностями разного типа. Для многих отдельных фрагментов сиквенса ДНК (скаффолдов) остаются неизвестными ни их локализация в определенном хромосомном плече, ни порядок расположения вдоль хромосомы, ни ориентация относительно центромеры. Единственный метод, который может дать однозначный ответ на эти вопросы, — это метод FISH (флуоресцентная *in situ*-гибридизация) на хромосомах. Обычно для FISH-картирования гетерохроматина используют митотические хромосомы, но разрешение метода в этом случае довольно низкое (1Mb). Известно, что гигантские политенные хромосомы слюнных желез дают высокое разрешение метода FISH (10 kb), однако в норме ПГХ в них значительно недопредставлен. Мы предложили дополнительно использовать для картирования гетерохроматина политенные хромосо-

мы слюнных желез, полученные из двойных мутантов *Su-UR Su(var)3-9⁰⁶*. Отсутствие двух важных белков гетерохроматина — SUUR и SU(VAR)3-9 — приводит к снижению недорепликации ПГХ в политенных хромосомах и образованию в хромоцентре его дополнительных блоков, имеющих дисковый рисунок. Мы локализовали на политенных хромосомах мутантов ряд генетических маркеров, положение которых в гетерохроматине митотических хромосом было известно, и, таким образом, установили корреляцию между новыми структурами гетерохроматина на политенных хромосом у мутантов *SuUR Su(var)3-9⁰⁶* и гетерохроматиновыми блоками метафазных хромосом. Это расширило наши возможности при последующем картировании ВАС-клонов на политенных хромосомах, а также позволило проводить сравнение наших данных с данными FISH-картирования на митотических хромосомах (P. Dimitri).

В результате совместной работы мы прокартировали 69 ВАС-клонов: впервые была определена локализация в конкретной хромосоме для 13 ВАС-клонов; установлено взаиморасположение 21 ВАС-клона; определена ориентация 14 скаффолдов (28 ВАС-клонов) относительно центромеры. Кроме того, были уточнены границы зон перехода эухроматина в гетерохроматин для всех хромосом. Наши данные позволили произвести три объединения соседних скаффолов с получением крупных контигов.

В настоящее время шестая, заключительная, версия последовательности гетерохроматина DHGP, в которую вошли полученные нами данные, находится в завершающей стадии разработки.

СОМАТИЧЕСКИЕ И ОГРАНИЧЕННЫЕ КЛЕТКАМИ ЗАРОДЫШЕВОЙ ЛИНИИ ХРОМОСОМЫ *CHIRONOMUS PLUMOSUS* (DIPTERA, CHIRONOMINAE).
© С. Ю. Демин, Буй Тхи Линь Ту. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Диминция хромосом (ДХ) — один из путей дифференцировки соматических клеток в зародыше за счет избирательной элиминации определенных хромосом набора в ходе делений дробления. В результате ДХ формируется соматический набор хромосом (S-кариотип), состоящий из так называемых S-хромосом. Нередуцированный набор хромосом и исходный кариотип обычно сохраняются только в клетках зародышевой линии (GL-клетках). ДХ описана у отдельных видов беспозвоночных животных — представителей более чем 200 семейств. Среди Diptera она найдена в 3 семействах подотряда Nematocera. Элиминирующиеся при ДХ хромосомы, или, что то же самое, хромосомы, ограниченные GL-клетками (germ-line limited chromosome), в этих семействах обозначаются по-разному: у видов сем. Chironomidae (комары-звонцы) — K-хромосомы, сем. Cecidomyiidae (галловые мошки) — E-хромосомы, сем. Sciaridae (грибные мошки) — L-хромосомы (Гришанин и др., 2006). K-хромосомы найдены у нескольких видов Orthoclaadiinae — одного из 11 подсемейств обширного сем. Chironomidae. Остальные подсемейства хирономид в этом аспекте совершенно не изучены. В цитогенетическом отношении удовлетворительно обследованы K-хромосомы лишь одного вида — *Acricoides lucidus*. Это единственный вид хирономид, для которого опубликованы изображения всех G-сегментированных хромосом метафазного набора. Вместе с тем и здесь

нет ни идиограмм, ни каталогизации G-бэндов индивидуальных хромосом. Кариотипы мейотических хромосом ни для одного из видов хирономид до сих пор не опубликованы. Выявление и описание K-хромосом осуществляют на препаратах спрэдов митотических хромосом гониальных клеток женских и мужских гонад личинок последнего возраста. Традиционная техника получения таких спрэдов была успешно использована только на личинках *A. lucidus*. По нашим данным, на личинках хирономуса она не срабатывает из-за ассоциации митотических хромосом в единую структуру вязким белковым компонентом развитого хромосомного «чехла» (chromosome coat). Этот «чехол» не разрыхляется после действия гипотонического раствора цитрата Na, используемого обычно в цитогенетике животных. Нам удалось получить спрэды митотических, а затем и мейотических хромосом хирономуса, пригодные для кариотипирования, только после длительного подбора единственной эффективной комбинации — 10—20 мин гипотонической обработки гонад 40—50 mM KCl и последующего растягивания митотических фигур по методу Денга и соавторов (Deng et al., 2003). Используя точный таксономический диагноз вида по политенным хромосомам S-кариотипа клеток слюнных желез личинок из природной популяции и спрэды хромосом соматических и гониальных клеток женских и мужских гонад этих же личинок, мы описали кариотипы и построили идиограммы G-сегментированных хромосом *Chironomus plumosus* — самого изученного вида хирономид центрального подсем. Chironominae. Были охарактеризованы метафазный и прометафазный кариотипы соматических цистоцитов семенников и фолликулярного эпителия яичников, а также кариотипы GL-клеток (сперматогониев, пахитенных и диплотенных сперматоцитов, оогониев и эндоредуцирующихся трофоцитов). GL-клетки *Ch. plumosus* содержат 4 пары S-хромосом и 5 пар K-хромосом. K-набор стабилен по составу, и в него входят половые хромосомы (XY у самцов и XX у самок). В эндометафазных трофоцитах нами найдено диплоидное число S-хромосом и от 2 до 10 полных наборов K-хромосом, что свидетельствует об их избирательной или форсированной амплификации. Не исключено, однако, что S-хромосомы трофоцитов подвергаются политенизации.

ФУНКЦИЯ БЕЛКОВ DAXX И RASSF1 В РЕГУЛЯЦИИ МИТОЗА ОПРЕДЕЛЯЕТ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ХЕМОТЕРАПИИ ТАКСОЛОМ. © С. Джювиназзи, К. Р. Лундси, В. М. Морозов, А. М. Ишов. Онкологический научный центр РАМН, Москва, и Факультет биологии клетки, Университет Флориды, Гейнсвилл, Флорида, США.

Daxx — консервативный ядерный белок, регулирующий апоптоз и транскрипцию. Повышенный митотический индекс в *Daxx^{-/-}* мышечных эмбрионах и анеуплоидия *Daxx^{-/-}* клеточных линий позволяют предположить функцию Daxx в митозе и клеточном делении. Для изучения этой модели мы использовали цейтраферную микросъемку (time-lapse microscopy) клеток, нокаутированных по Daxx, и обнаружили, что Daxx необходим для прохождения митоза. Кроме того, Daxx необходим для своевременной деградации циклина B1 в митозе. Современная модель хемотерапии таксанами предполагает значительную роль белков-регуляторов митотического блока в процессе клеточного ответа на данную хемотерапию. Мы обнаружили, что пониженный уровень или нокаутирование

Дахх в клеточных линиях увеличивает резистентность клеток к обработке таксоллом; подобная резистентность часто встречается у пациентов с раком груди и другими онкологическими заболеваниями. Дахх взаимодействует с онкорепрессором белком Rassf1, который в свою очередь связывается с тубулином и необходим для прохождения митоза и клеточного деления. В интерфазе Дахх локализуется в ядре, накапливаясь в ПМЛ-доменах (PML NBs/ND10) и в гетерохроматине. В прометафазе Дахх освобождается из PML NBs и колокализуется с Rassf1 на митотических полюсах. Нокаутирование Rassf1 также увеличивает резистентность к обработке таксоллом. Экспрессия минимального участка Rassf1, необходимого для взаимодействия с Дахх, является достаточным для предотвращения взаимодействия между Дахх и Rassf1, ингибирования прохождения митоза и увеличения резистентности к обработке таксоллом. Нокаутирование Дахх и Rassf1 приводит к резистентности к обработке таксанам в мышечных ксенографтных моделях; у пациентов с раком груди обнаружена корреляция между высоким уровнем Дахх и положительным клиническим ответом на химиотерапию таксанам.

Эти данные позволяют предположить функцию белков Дахх и Rassf1 в выходе из митотического блока, вынуждающего клетки заканчивать деление в условиях стресса (в частности, при обработке таксоллом). Результатом выхода из митоза в условиях блокированного митотического аппарата являются образование микроядер и клеточная смерть. Клетки с низким количеством и(или) мутациями Дахх и Rassf1 при обработке таксоллом не могут преодолеть митотический блок и накапливаются в митозе. После удаления таксола (в экспериментах с клеточными линиями) или деградации/вывода из организма (в случае химиотерапии) такие клетки могут завершить процесс деления, становясь, таким образом, устойчивыми к таксоллу. Мы предполагаем, что белки Дахх и Rassf1 могут быть использованы как маркеры при выборе химиотерапии для онкологических пациентов.

РОЛЬ ПОЛИ(АДФ-РИБОЗИЛ)ИРОВАНИЯ ЯДЕРНЫХ БЕЛКОВ В МЕХАНИЗМАХ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ДОКСОРУБИЦИНА. © А. С. Ефремова, С. И. Шрам. Институт молекулярной генетики РАН, Москва, gavennaru@rambler.ru.

Доксорубин является сильным генотоксическим агентом, широко применяемым в терапии онкологических заболеваний. Механизмы цитотоксичности доксорубина основаны на его способности интеркалировать между парами азотистых оснований в молекуле ДНК. Это приводит к нарушению матричной активности ДНК в процессе репликации и транскрипции. Кроме того, в результате его метаболизма в клетке образуются высокоактивные свободные радикалы, вызывающие образование одноцепочечных разрывов в цепи ДНК. Известно, что одним из наиболее ранних ответов клетки на такого рода повреждения ДНК является активация фермента поли(АДФ-рибоза)-полимеразы-1 (ПАРП-1), вовлеченной в процессы репарации, рекомбинации и репликации ДНК, а также в различные механизмы гибели клетки. Все эти эффекты связаны с реакцией поли(АДФ-рибозил)ирования ядерных белков, катализируемой этим ферментом. Целью нашей работы было выяснение роли ПАРП-1 в механизмах цитотоксического

действия доксорубина на нормальные и опухолевые клетки человека.

Исследования проводились на культуре клеток опухоли яичника человека SKOV-3 и первичной культуре клеток фибробластов легких эмбриона человека. Показано, что 72-часовая инкубация клеток SKOV-3 с доксорубином (20—500 нМ) приводила к сильному подавлению роста клеток в культуре (МТТ-тест). При этом при концентрации доксорубина >100 нМ количество клеток в конце инкубации даже снижалось по сравнению с исходным. Цитотоксическое действие доксорубина проявлялось также и в отношении нормальных фибробластов человека, хотя и в гораздо меньшей степени, чем в культуре клеток SKOV-3. При концентрации доксорубина 20 нМ количество клеток SKOV-3 снижалось примерно на 60 %, тогда как в культуре нормальных фибробластов человека — только на 20 %.

Сравнивали способность доксорубина и других ДНК-повреждающих агентов стимулировать реакцию поли(АДФ-рибозил)ирования в нормальных и опухолевых клетках. С помощью иммуноцитохимического окрашивания фиксированных препаратов клеток SKOV-3 на поли(АДФ-рибозу) было показано, что 72-часовая инкубация клеток с доксорубином в концентрации 20 нМ приводит к заметному возрастанию поли(АДФ-рибозы) в ядрах по сравнению с контрольными культурами. В присутствии ингибиторов ПАРП-1 (3-аминобензамида, 5-AIQ, PJ34 и др.) доксорубин практически не влиял на уровень поли(АДФ-рибозы) в ядрах клеток. В докладе также будут представлены данные о влиянии ингибиторов ПАРП-1 на цитотоксическое действие доксорубина на нормальные и опухолевые клетки человека.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-01770-а).

ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПОДДЕРЖАНИЯ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР В КЛЕТКАХ БУРОЗУБОК С ДЛИННЫМИ ТЕЛОМЕРАМИ. © Н. С. Жданова,¹ Ю. М. Мишина,¹ Т. В. Карамышева,¹ М. Э. Зверева,² Д. А. Скворцов,² Н. Б. Рубцов,¹ А. Лондоно.³ ¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, ²Химический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова и ³Институт Кюри, Париж, Франция, zhdanova@bionet.nsc.ru.

Теломеры представляют собой нуклеопротеиновые структуры, копирующие концы хромосом и предотвращающие их слияния. Теломеры содержат повторяющиеся последовательности ТТАГГГ на отстающей в ходе репликации нити ДНК и теломероспецифичный белковый защитный комплекс (shelterin), который осуществляет взаимодействие однострочного Г-обогащенного конца теломеры с двунитчатыми теломерными повторами. Длина теломера является важным функциональным показателем. У человека и диких видов млекопитающих она, как правило, не превышает нескольких десятков т. п. н. и поддерживается с помощью активной теломеразы. Но в 10—15 % опухолей человека и на ранних этапах эмбрионеза млекопитающих длина теломер поддерживается в основном с помощью ALT (Alternative Lengthening of Telomere), основанного на рекомбинационных механизмах. Маркерами ALT-клеток являются длинные теломеры, от-

сутствие активной теломеразы, пострепликационные теломерные обмены и наличие APBs-телец (ALT-зависимые внутриядерные PML-тельца). Один из видов бурозубок — бурозубка обыкновенная *S. granarius* — характеризуется теломерами необычной или редко встречающейся у млекопитающих длины, локализации и структуры. На проксимальных концах 32 акроцентриков этого вида локализованы теломеры, содержащие в среднем 213 т. п. н. теломерного повтора. Эти теломеры либо содержат рибосомные повторы, либо к ним прилегают ядрышковые организаторы. На остальных концах хромосом локализованы короткие теломеры размером 3.8 т. п. н. Однако теломеры вида-близнеца обыкновенная бурозубка *S. araneus* похожи на теломеры человека и имеют размер 11—18.5 т. п. н. Таким образом, близкородственные виды, кариотипы которых составлены из практически идентичных хромосомных плеч, могут различаться по структуре терминальных районов хромосом (Zhdanova et al., 2005, 2007; Жданова и др., 2009). Изучение морфофункциональной организации длинных теломер показало, что поддержание длины этих теломер в первичных фибробластах *S. granarius* осуществляется главным образом за счет теломеразы, активность которой почти в 1.5 раза превышает ее активность в клетках HeLa. При переходе фибробластов *S. granarius* из статуса первичных в статус превиваемых (культивирование в течение 2 лет) не наблюдалось признаков кризиса клеточного роста, характерного для трансформации клеток большинства видов млекопитающих. Не исключено, что трансформация фибробластов *S. granarius* сопровождается не ингибированием — активацией теломеразы, а просто повышением ее активности. Кроме того, мы обнаружили в первичных фибробластах *S. granarius* признаки ALT, указывающие на возможность ограниченного участия рекомбинационных механизмов в поддержании длины теломер у этого вида. Кроме длинных теломер в фибробластах *S. granarius* были выявлены APBs-тельца и колокализация с ними Rap1 (белка защитного комплекса теломер), а также пострепликационные обмены между длинными теломерами сестринских хроматид, число которых увеличивалось при длительном культивировании клеток. Тем не менее как длинные, так и короткие теломеры *S. granarius* хорошо выполняют функцию защиты концов хромосом от слияний. В длительно культивируемых фибробластах мы не наблюдали ни Робертсоновских, ни тандемных слияний хромосом.

ЭКОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ В-ХРОМОСОМ.
© Ю. Н. Иванов. Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск.

Кроме облигатных, так называемых А-хромосом (А-хр.), у многих видов растений-перекрестников (кукуруза, рожь, плевел и др.) и у животных (серебристая лисица, лесные мыши, лемминги и др.) встречаются факультативные сверхкомплектные, дополнительные, или В-хромосомы (В-хр.). Они присутствуют не у всех особей популяции, но у носителей их число обычно мало, ибо они оказывают угнетающее действие и снижают приспособленность тем сильнее, чем больше их число в кариотипе. У ржи *Secale cereale* число хромосом равно $2n = 14 + (0 - 9)$ В-хр., чаще бывает от 0 до 4 В-хр. при частоте их носителей в популяции от 0 до 90 %. В-хр. не гомологичны А-хр., не конъюгируют с ними, плотность

укладки ДНК у них больше. Они генетически пассивны и называются субинертными. Анеуплоидия по В-хр. в отличие от А-хр. выражается слабо и состоит в том, что угнетающее действие В-хр. особенно усиливается при нечетности их числа.

Было загадкой то, почему, несмотря на свои вредные свойства, В-хр. сохраняются у вида, а не элиминируются отбором, пока не был открыт их накопительный механизм (Hasegawa, 1934). Он впервые был обнаружен у ржи и состоит в том, что в развивающемся гаметофите (зародышечном мешке или пыльце) при определенном делении нередко происходит такое нерасхождение В-хр., что обе дочерние В-хр. попадают преимущественно в генеративное ядро, т. е. в гамету, а не в сопутствующие клетки, поэтому В-хр. встречаются в гаметах и передаются следующему поколению чаще, чем ожидается из сегрегации по Менделю. Очевидно, В-хр. служат ограничению численности вида при повышенной плотности популяции, т. е. самоизреживанию по Лысенко, и в пользу этого имеются сильные доводы.

1. Исследование влияния на среднее число В-хр. у ржи условий местности, сезона и густоты посева обнаружило, что при худших условиях и особенно в густом посеве число В-хр. существенно падает, так как носители В-хр. элиминируются сильнее, чем неносители (Rees, Ayonoadu, 1973).

2. Исследование влияния плотности популяции на число В-хр. в родительском P и в дочернем F_1 поколениях у ржи показало, что в поколении P количество В-хр. существенно падает с ростом плотности популяции, что вполне понятно; но вопреки ожиданию оно более или менее сохраняется в F_1 , что, очевидно, указывает на усиление действия накопительного механизма при повышении плотности популяции (Teoh, Jones, 1978). Накопление В-хр. в F_1 необходимо для того, чтобы самоизреживание продолжалось и в потомстве, которому при высокой плотности популяции родителей тоже грозит перенаселенность. Регрессионный анализ рассматриваемых данных для 2 исследованных популяций ржи показывает, что зависимость относительного прироста δ (в %) среднего числа В-хр. в потомстве F_1 по сравнению с родителями P от плотности популяции x есть возрастающая функция 1) $\delta(x) = 23.13 + 0.1358x$ и 2) $\delta(x) = 22.33 + 0.4993x$. Хотя коэффициенты регрессии существенно не отличаются от нуля, сходство обеих повторностей увеличивает вероятность того, что результат неслучаен (Иванов, 2007).

Действие В-хр. не зависит от наследственной конституции особи (Müntzing, 1967). 1. Оно сравнивалось в диплоидах и автотетраплоидах ржи при одних и тех же условиях. Буферное влияние удвоенного числа А-хр. на действие В-хр. казалось естественным, но не имело места. Вредное влияние В-хр. на фертильность и силу у диплоидов и у тетраплоидов оказалось одинаковым. 2. В-хр., введенные из ржи в пшеницу, которая в норме их не имеет, проявляли свое негативное действие совершенно так же, как и у ржи. Если бы существовали и появлялись генотипы, устойчивые к угнетающему действию В-хр., то отбор привел бы к их преобладанию в популяции и В-хромосомная регуляция численности оказалась бы бездейственной.

Согласно атласу В-хромосомных видов (Jones, Rees, 1982), из 1281 вида с В-хр. цветковые растения составляют 1018 (80 %), а животные — 263 (20 %). Это согласуется с представлением, что В-хр. более нужны фиксированным *in situ* растениям, чем подвижным животным, для ре-

гуляции численности путем самоизреживания. Сидячие формы животных аналогично растениям нуждаются в самоизреживании. Поэтому следует ожидать, что видов с В-хр. среди них не меньше, чем среди растений, и, во всяком случае, больше, чем среди подвижных, неприкрепленных форм. С этой точки зрения кариотипическому исследованию на В-хр. подлежат те таксоны царства животных, в которых очень много сидячих форм.

Роль В-хр. в регуляции численности вида подтверждают такие явления. 1. При высокой плотности популяции преимущественную гибель обнаруживают носители В-хр., за счет которых и происходит самоизреживание. 2. Существует накопительный механизм В-хр., который включается, активизируется и все сильнее нагнетает В-хр. в популяцию при повышении плотности, когда требуется сокращение численности вида. 3. Угнетающее действие В-хр. не зависит от генотипа, и этим надежно обеспечивается их регуляторная функция, ибо при существовании наследственных типов, резистентных к В-хр., они фиксировались бы в популяции, расстраивая регуляцию численности и разрушая экосистему. 4. В-хр. чаще встречаются у растений, чем у животных, так как последние подвижны и могут регулировать плотность популяции миграцией, тогда как фиксированные на месте растения вынуждены пользоваться самоизреживанием, для которого служат

ЭКОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ СТРОЕНИЯ КАРИОТИПА ВИДА. © Ю. Н. Иванов. Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск.

Секвенирование геномов показало, что сложность человека с его суперсложной социальной организацией и жизнью не соответствует относительной простоте его генома, число генов которого недостаточно превосходит таковое у других видов и, возможно, уступает некоторым из них. Факторы социальной наследственности у человека играют выдающуюся роль, и без эпигенетики, понимаемой шире, чем это обычно принято, его наследственность не может получить удовлетворительного описания. Нет резона ограничивать ее только геномом и иными структурами клетки, но определенно следует включать в нее эпигены из внешней среды. Эпигены — это любые факторы, помимо генома, необходимые для развития видоспецифической организации особи. В этом существо концепции единства организма и среды, которую в свое время защищал Г. Д. Лысенко и которая теперь робко возрождается под названием эпигенетики. Вместе с тем организация генома вида отнюдь не замкнута в самой себе, а служит для регуляции экосистемы, т. е. коллективному интересу всех ее видов.

Исследования мутационного процесса у мушки *Drosophila melanogaster* позволили разложить его на основные типы мутаций и выяснить их регуляторную роль в экосистеме. Оказалось, что избыточность ДНК, число хромосом в кариотипе, неадаптивные особенности его строения и структуры хромосом, задавая темп мутаций и придавая им летальность, имеют прямое отношение к регуляции численности вида и получают экологическое объяснение. Разбиение множества мутантных гамет *D. melanogaster* на летальные и нелетальные показывает, что их доли составляют 97 и 3 % соответственно. При этом 2/3 всех мутантных гамет несут доминантные летальные мутации (ДЛМ), среди которых 92 % хромосом-

ных и 8 % генных (Ivanov, 1998a, 1998b). Хромосомные ДЛМ суть разрывы хромосомных плеч и потери их ацентрических фрагментов, приводящие к более или менее крупным делециям. Мутационный процесс является серьезным источником смертности в популяции, вызывая при обычных условиях гибель около 4 % зигот. Смертность от ДЛМ практически прямо пропорциональна мутабельности и может достигать 10 % и более (Ivanov, 1999).

Оказалось, что мутабельность зависит от плотности популяции как возрастающая функция, из чего следует, что она является одним из факторов регуляции численности вида (Ivanov, Ivannikov, 1994). Это подтверждается тем, что факторы спонтанной мутабельности в популяциях имеют биотическую природу и их действие зависит от экологической обстановки. У *D. melanogaster* это инсерционный мутагенез, MR-факторы, вирусы, трансдукция, гены-мутаторы, парамутации и т. п. Естественный фон радиации не играет существенной роли, ибо, согласно оценкам удваивающей дозы, вызывает ничтожно малую долю всех спонтанных мутаций, так что даже многократные его изменения не имели бы сколько-нибудь заметного влияния на мутабельность в природе.

Избыточная ДНК (повторы и другие некодирующие участки между генами и интроны внутри гена) занимает у человека более 98 % генома и у большинства других эукариотических видов не менее 80 %. Это увеличивает уязвимость генома для ДЛМ, удлиняя нить ДНК и увеличивая размер мишени, поражаемой мутациями, почти на 2 порядка, благодаря чему изменения мутабельности регулируют численность вида. Прямым указанием назначения избыточной ДНК повышать мутабельность в гаметах является диминуция хроматина, наблюдаемая у ряда видов с четко выявляемым зародышевым путем (у циклопов, аскарид и др.). Диминуция состоит в том, что в онтогенезе избыточная ДНК удаляется из клеток сомы, но всегда сохраняется в гаметах, именно там, где необходимо повышать мутабельность для повышения смертности в целях сокращения численности вида.

Уровнем ДЛМ, необходимым для регуляции численности вида, задается число хромосомных плеч в его кариотипе. При некоторой идеализации показано, что среднее число хромосомных ДЛМ в геноме вида есть убывающая функция от числа f хромосомных плеч в кариотипе:

$$A(f) = \begin{cases} k(1 - \alpha f) \dots & \text{при } \alpha f < 1 \\ 0 \dots \dots \dots & \text{при } \alpha f \geq 1 \end{cases},$$

где k и α — положительные константы. При увеличении (уменьшении) числа плеч их генетическое содержание уменьшается (увеличивается) и их потери при разрывах становятся менее (более) вредными и опасными. Пример *D. melanogaster* показывает, что этот вид, на котором непосредственно обнаружена регуляторная роль мутабельности, вместе с тем имеет малое число хромосом и в общем весьма крупные, генетически содержательные хромосомные плечи, обеспечивающие высокую смертность от ДЛМ, необходимую для ограничения численности вида.

Не только кариотип в целом, но и строение отдельных хромосом создает повышенную уязвимость генома для ДЛМ. При достаточной величине хромосомы практически любые ее разрывы ведут к ДЛМ, потому что *зухроматин в хромосоме всегда локализуется терминально, а блочный гетерохроматин — при центромере*. Будь на-

оборот, хромосомных ДЛМ было бы очень мало. Акроцентрическое строение хромосом по сравнению с метацентрическим является неадаптивным, ибо тоже увеличивает риск ДЛМ. Сравнивая акро- и метацентрики с одинаковыми генетическим содержанием и длиной, не трудно видеть, что разрывы акроцентрика более опасны, ибо ведут в среднем к большим делециям, чем разрывы метацентрика. Тем не менее крупные акроцентрики широко распространены в кариотипах видов, что указывает на их полезную ограничивающую и регуляторную роль.

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ИНДУЦИБЕЛЬНОГО ГЕНА В ЯДЕРНЫХ ПЛАЗМИДАХ ДРОЖЖЕЙ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ПОЗИЦИОНИРОВАНИЯ НУКЛЕОСОМ. © Л. В. Исаева, В. В. Ширягин, Л. Н. Кинцурашвили, Г. И. Курьянов. НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного Университета им. М. В. Ломоносова.

В созданных нами конструкциях ген неомидинфотрансферазы (NPTII), обеспечивающий рост клеток на антибиотике генетине (G418), встроен под индуцибельный галактозой промотор GalCus. Ранее мы показали, что в репрессированном состоянии нуклеосома закрывает оба ТАТА-боксы на промоторе, а индукция промотора осуществляется при экспонированности ТАТА-боксов. При этом нуклеосома смещается с ТАТА-боксов. При детальном исследовании уровня экспрессии гена в индуцибельных условиях оказалось, что расстояние от ТАТА-боксов, на которое может сместиться нуклеосома, определяет уровень экспрессии. Мы интегрировали между промоторной частью и началом структурной части гена последовательность с сильным позиционирующим сигналом (укороченный мономер сателлитной ДНК мыши длиной 122 п. о.). В этой конструкции уровень индуцибельной экспрессии гена возрастает в 2.0—2.5 раза. При этом слайдинг нуклеосомы от ТАТА-боксов на эту последовательность ДНК должен приводить к экспонированности двух-трех дополнительных точек инициации из семи присутствующих на Cus-части промотора.

В одной из созданных нами конструкций ген NPTII инвертирован по отношению к промотору, но экспрессируется в условиях репрессии промотора и обеспечивает рост клеток на антибиотике. Это определяется конститутивным синтезом мРНК с ТАТА-подобного элемента, расположенного в FRT-последовательности, перед началом структурной части гена. Неожиданным оказалось наблюдение, что индукция GalCus-промотора в этой конструкции приводит к репрессии продукции гена. Этот феномен может быть объяснен синтезом антисмысловой РНК с инвертированной последовательности гена NPTII, что требует дополнительного экспериментального подтверждения.

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ТРАНСКРИБИРУЮЩЕГОСЯ ХРОМАТИНА. © И. И. Куреев. НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

Общепринято, что хроматин в интерфазном ядре находится в высококомпактизованном состоянии, но активно транскрибирующиеся участки генома деконденсиру-

ются до уровня нуклеосомных фибрилл. Для изучения организации хроматина в транскрибирующихся локусах был разработан новый подход для визуализации индивидуальных участков генома в живых клетках. В отличие от предыдущих методов он использует в качестве повторяющихся элементов протяженные фрагменты генома млекопитающих (около 150 т. п. н.), небольшое число которых tandemно интегрировано в хромосому. Такие конструкции лишены ограничений, характерных для плазмидных повторов. Каждая копия повторяющегося элемента содержит небольшой участок сайтов связывания Lac-репрессора, соединенного с GFP, что позволяет осуществлять микроскопический анализ этих искусственных конструкций *in vivo*. Были созданы трансгенные конструкции на основе бактериальных искусственных хромосом (BAC), содержащих индуцибельные гены млекопитающих. Как и ожидалось, индукция экспрессии этих генов вызывала деконденсацию трансгенного локуса в серию коллинеарных точек (соответствующих сайтам связывания Lac-репрессора-GFP). Однако при измерении расстояний между точками выяснилось, что степень деконденсации, наблюдаемая при активации транскрипции, существенно ниже, чем ожидалось: в среднем локус деконденсировался до уровня, в 100 раз превышающего коэффициент компактизации нуклеосомной фибриллы. Результаты такого анализа показывают, что транскрипция может происходить на относительно плотно упакованной ДНК. При этом уровень экспрессии трансгенов близко соответствовал уровню экспрессии соответствующих эндогенных генов, при том что активными были практически все копии трансгена. Важно отметить, что деконденсация наблюдалась вне зависимости от того, где располагались маркерные последовательности lac-оператора — вне транскрибируемого гена или внутри него.

Также было обнаружено, что трансгенные локусы, содержащие ген Hsp70, при активации оказывались в тесном контакте с кластерами интерхроматиновых гранул — ядерными доменами, обогащенными факторами сплайсинга мРНК. Ранее предполагалось, что факторы сплайсинга рекрутируются из этих доменов в область транскрипции. В данной работе были проведены прямые наблюдения за поведением трансгенов и кластеров интерхроматиновых гранул в живых клетках. Было показано несколько типов ассоциации, включая образование новых кластеров, увеличение предсуществующих соседних кластеров, а также миграцию генных локусов по направлению к кластеру. Последний сценарий представляет собой еще один пример перемещения генных локусов на большое расстояние. Данные наблюдения поддерживают точку зрения о роли кластеров интерхроматиновых гранул как функциональных сайтов, способных рекрутировать активные гены.

Прижизненные наблюдения также выявили высокую локальную подвижность трансгенных конструкций, причем индивидуальные копии трансгена двигались независимо друг от друга. Подобная подвижность описывается в терминах ограниченной диффузии, однако в данном случае речь идет о подвижности транскрибирующихся локусов, что свидетельствует против модели прикрепления транскрипционной машинерии к стабильным скелетным структурам ядра.

УЧАСТИЕ ВНУТРИЯДЕРНОГО МИОЗИНА В БИОГЕНЕЗЕ И ТРАНСПОРТЕ ПЕРИБИОСОМНЫХ РНК. © Е. В. Ку-

селева,¹ А. Обрдлик,² Е. Лувет,² А. Кукалев,² Д. Нацекин,¹ Б. Фахренкрод,² П. Персипале.¹ ¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, и ²Каролинский Институт, Стокгольм, Швеция, Базельский Университет, Швейцария.

В последние годы получены доказательства участия внутриядерного актина и миозина I (NM1) в различных этапах регуляции экспрессии генов. Эти белки входят в состав хроматинре моделирующего комплекса, рибонуклеопротеидных (РНП) частиц, ассоциируются с активными эукариотическими РНК-полимеразами и вовлечены во внутриядерный транспорт молекул. Недавно показано, что актин в кооперации с NM1 выявляется в составе транскрипционного комплекса рибосомных генов и прерибосомных субъединиц, транспортируемых в цитоплазму. Кроме того, установлено, что NM1 способен взаимодействовать с эмерином, ламинсвязывающим белком ядерной оболочки. На основании этих данных было высказано предположение об участии NM1 и актина в биогенезе и транспорте прерибосомных РНП, однако четких подтверждений этого получено не было.

Целью нашей работы было установить, в каких этапах биогенеза прерибосомных субъединиц и их экспорта из ядра участвует внутриядерный миозин. Эксперименты проводились с использованием антител к актину, NM1 и белкам ядерных пор с помощью молекулярно-биологических, электронно-микроскопических и иммуногистохимических методов. В качестве объектов использовали культуру клеток HeLa и ранние ооциты ксенопуса. Ультрацентрифугирование ядрышковых экстрактов, выделенных из клеток HeLa, выявило РНК-зависимое осаждение NM1с прерибосомными субъединицами. РНК-иммунопреципитация показала, что NM1 обнаруживается во фракциях прерибосомных РНК, а также 18S рРНК, 5.8S рРНК и 28S рРНК, однако отсутствует во фракциях 5S рРНК и 7SL РНК. Ингибирование функций актина и NM1 нарушало процессинг 36S рРНК. Иммуноэлектронная микроскопия, проведенная на срезах клеток и изолированных из ооцитов ксенопуса ядрах, позволила впервые продемонстрировать связь NM1 с баскет-структурами ядерных поровых комплексов. Кроме того, NM1 был обнаружен на актинсодержащих внутриядерных филаментах, контактирующих с ядерными порами. Установлено также, что 18S рРНК и 28S рРНК, но не 5S рРНК помимо NM1 преципитируют вместе с CRM1 и нуклеопорином Nup153, который, как известно, принимает активное участие в транспорте молекул между ядром и цитоплазмой. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что NM1 в кооперации с внутриядерным актином действительно принимает участие в биогенезе рибосом, а именно в транскрипции рРНК и созревании прерибосомных частиц, их транспорте в ядре, а также экспорте из ядра в цитоплазму через ядерную пору.

РОЛЬ АПОПТОЗА В МЕХАНИЗМАХ РАЗВИТИЯ ИНВОЛЮЦИИ ТИМУСА ПРИ ОПУХОЛЕВОМ РОСТЕ.
© Е. П. Киселева. НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург.

Апоптоз (запрограммированная клеточная гибель) сопровождается рядом биохимических и морфологических изменений в клетке. Фрагментация ДНК под действием Са-зависимой эндонуклеазы сопровождается выраженными

изменениями ядра, в котором происходят набухание, конденсация хроматина с последующей фрагментацией и образованием характерных апоптотических телец. Среди клеток иммунной системы тимоциты обладают наиболее высокой чувствительностью к спонтанному апоптозу *in vitro*. Можно предположить, что эта способность тимоцитов отражает степень их дифференцировки, а также изменения клеточного метаболизма, затрагивающие пути передачи активационного сигнала.

Целью настоящего исследования было изучение способности тимоцитов к спонтанному апоптозу *in vitro* у мышей с сингенной перевиваемой опухолью гепатомой 22а, а также влияние фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) на этот процесс. Для изучения апоптоза суспензию клеток тимуса инкубировали в течение 2 ч при 37 °С в среде с добавлением 10 % телячьей сыворотки. Развитие апоптоза оценивали морфологическим методом по выявлению пикнотических ядер на гистологических срезах, по флуоресцентному окрашиванию (ФО) акридиновым оранжевым, биохимическим методом с помощью дифениламинового теста (ДФТ), а также регистрировали фрагментацию ДНК по электрофорезу в геле. В качестве положительного контроля использовали известный индуктор апоптоза — дексаметазон в концентрации 5 мкМ, добавление которого вызывало у контрольных мышей 40—50 % апоптоза во флуоресцентном и ДФТ-тестах.

У мышей с гепатомой 22а начиная с 21-х сут после подкожной инокуляции клеток опухоли отмечали прогрессирующую инволюцию тимуса, сопровождающуюся значительным уменьшением массы и клеточности тимуса. Гистологические исследования срезов тимуса выявили резкую делимфатизацию корковой зоны и увеличение в 2 раза числа клеток с пикнотическими ядрами на одно поле зрения на поздних сроках роста гепатомы по сравнению с контрольными животными. При ФО обнаружено трехкратное усиление спонтанного апоптоза на 28-е сут после перевивки опухоли, что было также подтверждено с помощью ДФТ.

Ранее было показано, что изменения в тимусе не связаны с повышением уровня кортикостерона в циркуляции при росте гепатомы. Мы предположили, что усиление апоптоза может быть связано с влиянием VEGF, продукция которого может существенно увеличиваться при росте опухолей.

Инкубация тимоцитов интактных мышей *in vitro* в течение 24 ч в присутствии 50 нг/мл VEGF вызывала усиление спонтанного апоптоза тимоцитов, что оценивали на проточном цитофлуориметре по уровню интенсивности пре-G₀/G₁ пика после окрашивания пропидиум иодидом (38.2 ± 1.0 % по сравнению с 33.8 ± 0.7 % в контроле, P < 0.05). Усиление апоптоза было также подтверждено в тесте, выявляющем связывание апоптотических клеток с Аннексином V.

Предполагается, что усиление апоптоза тимоцитов является одним из возможных механизмов инволюции тимуса при росте опухолей, а VEGF может играть существенную роль в этом процессе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00429).

НЕПОСТОЯНСТВО НАСЫЩЕНИЯ ДНК ХРОМАТИНА НУКЛЕОСОМАМИ. © Л. Н. Кинцурашвили, Л. В. Исаева,

В. В. Ширягин, С. А. Голышев, В. Ю. Поляков, Г. И. Кирьянов. НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

Мы исследовали сблоченность нуклеосом в хроматине клеток мышцы (культура L-клеток и гепатоциты) в разных функциональных состояниях клеток. Для этого мы определяли длину нуклеосомного повтора в олигонуклеосомах, выщепляемых из хроматина микрококковой нуклеазой в условиях углубления гидролиза. Длину нуклеосомного повтора в гидролизатах суммарного хроматина ядер определяли при сканировании электрофореграмм ДНК, выделенных из олигонуклеосом. Кроме того, определяли длину нуклеосомного повтора в хроматине сателлитной ДНК и теломерных районов. Для этого ДНК этих же гидролизатов хроматина гибридовали с радиоактивно мечеными зондами: мономером сателлитной ДНК (234 п. о.) и консенсусной последовательностью теломерной ДНК (TTAGGG)_n. Измерения и расчеты производили при использовании программы Gel-Pro Analyzer 3.1. Ясно, что при таком подходе из рассмотрения исключается ряд последовательностей ДНК, главным образом промоторные участки генов, расположение нуклеосом на которых определяется позиционирующими сигналами самой ДНК. Понятие нуклеосомного повтора в этом случае бессмысленно. Для суммарной ДНК и ДНК отдельных районов хроматина параметр длины нуклеосомного повтора выявляет степень насыщенности ДНК в хроматине нуклеосомами, т. е. определяет количество нуклеосом на единицу длины ДНК. Оказалось, что эта величина неконстантна и сильно варьирует в клетках при их различных функциональных состояниях. Исходя из представлений о сопряженности формирования хроматина (посадки нуклеосом на ДНК) и репликации ДНК можно предположить, что максимальное насыщение ДНК нуклеосомами должно происходить в ходе S-фазы. В то же время, учитывая данные о времени полужизни гистонов (и октамеров), можно было ожидать обеднения хроматина нуклеосомами в клетках с низким пролиферативным пулом. Реально мы наблюдаем минимальный размер мононуклеосомного повтора в L-клетках, синхронизированных в S-фазе, прошедших большую часть S-фазы. Величина нуклеосомного повтора в хроматине суммарной ДНК составляет 173 ± 5 п. о., близки к этому значению для хроматина сателлитной ДНК (170 ± 5 п. о.) и теломерных районов (176 ± 5 п. о.). В то же время в популяции непролиферирующих клеток (гепатоциты мышцы) длина нуклеосомного повтора существенно выше (192 ± 5 п. о.), что соответствует предположению об обедненности ДНК нуклеосомами. Примечательно, что этого не происходит в хроматине сателлитной и теломерной ДНК: длина нуклеосомного повтора составляет 169 и 170 п. о. соответственно. В клетках, искусственно синхронизированных в G₀-фазе, также не наблюдается увеличения длины нуклеосомного повтора для суммарной ДНК (178 ± 5 п. о.) и сателлитной ДНК (160 ± 5 п. о.), однако изменения касаются хроматина теломерных районов (182 ± 5 п. о.). Совершенно иной выглядит ситуация с асинхронной культурой L-клеток мышцы. В них выявляется максимальная длина нуклеосомного повтора в ДНК суммарного хроматина (195 ± 5 п. о.), а также в хроматине сателлитной ДНК (185 ± 5 п. о.) и теломерной ДНК (195 ± 5 п. о.). Динамичность изучаемого параметра выявлена также в условиях модификации структуры хроматина (гиперацети-

рование гистонов) и при изменении характера метилирования ДНК в ходе репликации.

В целом можно заключить, что, во-первых, насыщенность ДНК нуклеосомами не является константной величиной и, во-вторых, в клетке может существовать механизм поддержания количества нуклеосом в особых районах хроматина. О функциональном смысле выявленного феномена пока остается только догадываться.

Ah-РЕЦЕПТОРЗАВИСИМЫЕ И Ah-РЕЦЕПТОРНЕЗАВИСИМЫЕ ЭФФЕКТЫ ЛИГАНДОВ Ah-РЕЦЕПТОРА.
© В. А. Кобляков, М. С. Волков, В. А. Евтеев, Н. А. Соломатина. Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва.

Ксенобиотики (чужеродные вещества) способны вызывать изменения функций клеток как в результате взаимодействия активных метаболитов с макромолекулами клетки, в том числе с молекулой ДНК (генотоксическое действие), так и эпигеномные эффекты. По современным представлениям, эпигеномные эффекты обусловлены активацией орфаных рецепторов ксенобиотиков. К этим рецепторам относятся Ah-рецептор, constitutive androstane receptor и рецептор пролифераторов пероксисом. На примере наиболее изученного рецептора — Ah-рецептора — показано, что после взаимодействия с соответствующим ксенобиотиком активированный Ah-рецептор транспортируется в ядро, где в комплексе с белком ARNT функционирует как транскрипционный фактор. Происходит активация Ah-рецепторзависимых генов, таких как изоформы цитохрома p450, глутатион-S-трансфераза и др. Исследования последнего времени продемонстрировали, что активированный Ah-рецептор не только является транскрипционным фактором, но способен взаимодействовать с компонентами различных сигнальных цепей, изменяя их функционирование. Именно способность изменять функционирование компонентов сигнальных цепей связывают опухоль-промоторную активность лигандов Ah-рецептора, таких как хлорированные углеводороды, полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) и флавоны. Для выяснения вопроса о том, действительно ли негенотоксические эффекты лигандов Ah-рецептора обусловлены исключительно взаимодействием с Ah-рецептором, мы исследовали влияние на функции клеток гепатом, экспрессирующих Ah-рецептор (Hep G2) и не экспрессирующих его (Г-27). В обеих клеточных системах канцерогенные ПАУ, а также β-нафтофлаван вызывали стимуляцию пролиферации и ингибирование межклеточных щелевых контактов. В клетках Г-27 канцерогены из класса ПАУ активировали транскрипционный фактор NF-κB. Активацию определяли несколькими методами: по усилению связывания с консенсусным олигонуклеотидом, имеющим в структуре NF-κB-узнающую последовательность; по фосфорилированию I-κB; по усилению экспрессии мРНК I-κB. Активация NF-κB происходит благодаря фосфорилированию ингибирующего фрагмента I-κB с последующим его отщеплением. Имеется несколько механизмов фосфорилирования I-κB. Используя ингибиторы киназ, мы показали, что активация NF-κB реализуется через киназу IKK. В то же время в клетках Hep G2 усиления активности NF-κB при действии ПАУ не наблюдалось, но активировался транскрипционный комплекс AP-1, активации которого в клетках Г-27 не наблюдалось. Также в клетках Hep G2 канцеро-

генные ПАУ увеличивали уровень циклина E. Полученные результаты свидетельствуют о том, что помимо Ah-рецептора в клетках гепатом существует неизвестный ранее фактор, через который могут реализовываться эффекты канцерогенных ПАУ на такие функции клеток, как пролиферация и нарушение межклеточных щелевых контактов. При этом механизм пролиферации в клетках, экспрессирующих и не экспрессирующих Ah-рецептор, происходит по различному механизму при действии канцерогенных ПАУ.

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И ЦИТОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭМБРИОНОВ ВЬЮНОВ С ЭКСПРЕССИЕЙ GFP В ПРОЦЕССЕ ЭМБРИОГЕНЕЗА. © Л. В. Козикова,¹ Л. Е. Андреева,² Н. В. Хайдарова,² Л. А. Слепцова.³ ¹Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения с.-х. животных РАСХН, Санкт-Петербург—Пушкин, larkozik@list.ru, ²Институт молекулярной генетики РАН, Москва, leandr1@yandex.ru, и ³Международный биотехнологический центр, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова.

Методом микроинъекции в область бластодиска при помощи микроманипулятора и микроинструментов были введены дистиллированная вода в качестве контроля и плаزمиды рСЕЕGFP, содержащая репортерный ген GFP в двух модификациях в линейной или кольцевой форме под контролем промотора фактора элонгации человека и энхансера цитомегаловируса человека. Известно, что процесс микроинъекции достаточно травматичен. Гибель эмбрионов активно начинается сразу после микроинъекции и уже через 1 сут после оплодотворения составляет от 10 % при использовании кольцевой формы ДНК и 15 % — линейной формы. Число мертвых зародышей было 9 % при использовании линейной формы плазмиды рСЕЕGFP и 5.5 % — кольцевой к 120 ч развития эмбрионов. Получены трансгенные эмбрионы вьюнов, у которых экспрессия трансгена носила транзитный мозаичный характер, вследствие чего зародыши отличались друг от друга по паттерну экспрессии в процессе эмбриогенеза.

Новым подходом стала оценка гомеостаза у эмбрионов с введенными генетическими конструкциями, проведенная на цитологических препаратах с учетом процессов пролиферации и запрограммированной клеточной гибели. В контроле было проанализировано 1150 клеток эмбрионов вьюна. Количество пролиферирующих клеток составляло 3.65 %, а количество пикнотических — 1.45 %. Представляет интерес проследить динамику процессов пролиферации и запрограммированной гибели клеток в эмбрионах после введения генной конструкции, содержащей репортерный ген GFP в линейной и кольцевой формах. После введения линейной формы плазмиды в эмбрионы через 96 ч развития было проанализировано 1139 эмбриональных клеток. Количество митозов достоверно не отличалось от контроля и составляло 3.94 %. С другой стороны, количество пикнотических клеток (2.11 %) достоверно ($P \leq 0.5$) отличалось от контроля, что указывает на некоторые нарушения гомеостаза на данном этапе развития. Аналогичную тенденцию наблюдали у эмбрионов на стадии предличинки после введения кольцевой формы гена GFP в эмбрионы через 96 ч развития. Было проанализировано 1167 эмбриональных клеток, при этом количество митозов составляло 4.04 %, а пикнозов — 2.06 %, что также достоверно отличалось от контроля ($P \leq 0.5$).

Таким образом, показано нарушение соотношения процессов пролиферации и конечных стадий апоптоза у трансгенных эмбрионов по сравнению с контролем через 96 ч после введения плазмиды рСЕЕGFP.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований ОФИ_Ц (проект 09-04-13558).

ДЕКОНДЕНСАЦИЯ РАЙОНОВ ИНТЕРКАЛЯРНОГО ГЕТЕРОХРОМАТИНА ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ *DROSOPHILA MELANOGASTER* ПРИ ЭКТОПИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *SuUR*. © Е. Б. Козоза, Т. Д. Колесникова, И. А. Зыков, Е. С. Беляева, И. Ф. Жимулев. Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск.

Вопрос о механизмах, ответственных за упаковку хроматина высшего порядка, отражающуюся на морфологии политенной хромосомы, остается открытым, и каждый новый факт изменения состояния компактизации хроматина представляет интерес.

Экспрессия белка SUUR в системе GAL4-UAS в слюнных железах в конце третьего личиночного возраста под контролем Sgs3-GAL4 влияет на морфологию политенных хромосом, вызывая формирование так называемых «пузырей» — обратимых вздутий в районах прицентроммерного и интеркалярного гетерохроматина политенных хромосом.

Проведено исследование свойств этих обратимых вздутий в районах интеркалярного гетерохроматина, которые в норме представлены темными компактными дисками. Измерение размеров «пузырей», маркированных двумя зондами, попадающими в зону декомпактизации, позволило оценить степень упаковки ДНК в этих структурах. Она составляет в среднем 34 раза, что соответствует наднуклеосомному уровню упаковки (~36).

Результат иммуноокрашивания политенных хромосом антителами против РНК-полимеразы II свидетельствует об отсутствии в районе вздутий этого важнейшего компонента процесса транскрипции, что указывает на несходство механизма декомпактизации хроматина в пuffed-фах и «пузырях».

Во всех междисках политенных хромосом *Drosophila melanogaster* выявляется белок CHRIZ, который не присутствует в районах вздутий. Таким образом, продемонстрировано, что формирование «пузыря» не связано с приобретением соответствующего района свойств междиска или пuffed-фа.

ПРОИСХОЖДЕНИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ РНК X-ХРОМОСОМЫ МЛЕКОПИТАЮЩИХ. © Н. Н. Колесников,¹ Е. А. Елисафенко,² Е. А. Тутов.¹ ¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирский государственный университет, kolesnikovnn@mcb.nsc.ru, и ²Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск.

МикроРНК (миРНК) относятся к классу малых некодирующих РНК длиной 20—25 нуклеотидов, играющих важную роль в посттранскрипционном контроле экспрессии генов. Многочисленные исследования, проведенные к настоящему времени, свидетельствуют о том, что

миРНК участвуют почти во всех клеточных процессах, являются интегральными компонентами геномов животных, растений и вирусов. В базе данных miRBase (выпуск 14, сентябрь 2009; <http://www.mirbase.org/>) аннотировано более 10 тыс. опубликованных последовательностей миРНК из геномов 115 видов. Среди них самое большое представительство миРНК выявлено в геноме человека — 721 последовательность, 606 в геноме шимпанзе и 579 у мыши. И это не окончательный результат, по предварительным оценкам, в геноме человека может содержаться до 1 тыс. миРНК.

С целью выявления особенностей структурной организации генов, кодирующих миРНК, мы провели сравнительный анализ их распределения в аутосомах и X-хромосоме в геномах человека, мыши и ряда других млекопитающих. Оказалось, что распределение миРНК в геноме носит, скорее всего, неслучайный характер. Средняя плотность распределения миРНК в геноме человека в 2 раза ниже, чем у мыши, и составляет 0.23 миРНК на 1 Мб, тогда как у мыши 0.56 миРНК приходится на 1 Мб в геноме. Не выявлено прямой зависимости распределения числа миРНК генов от длины хромосомы и от числа белоккодирующих генов. В трех хромосомах — 14, 19 и X-хромосоме, составляющих 10 % от генома человека, локализовано более чем 30 % от всех последовательностей миРНК. X-хромосома содержит самое большое количество — 82 гена миРНК. Хромосома 21 содержит самое маленькое количество генов миРНК, всего 5 последовательностей. У мыши также хромосомы 2, 12 и X-хромосома превалируют над остальными хромосомами по содержанию генов миРНК.

X-хромосома находится на особом положении в геноме в сравнении с аутосомами из-за моноаллельной экспрессии, так как около 85 % белоккодирующих генов подвергаются инактивации в одной из двух X-хромосом у самок млекопитающих. Кроме того, X-хромосома отличается повышенным содержанием мобильных элементов — 55.6 % при среднем значении в геноме человека 45.5 %. Ранее мы показали, что процесс инактивации X-хромосомы имеет транспозонное происхождение. В настоящей работе мы установили, что 18 % всех миРНК произошли из различных классов транспозонов, а в X-хромосоме — более 20 %. Филогенетическое распределение и сравнительный анализ наборов миРНК генов X-хромосом человека и мыши показали, что только 40 % генов миРНК X-хромосомы являются общими для двух видов, остальные — специфическими. Часть миРНК генов имеет общее происхождение от позвоночных, но они были инактивированы и существуют в виде псевдогенов миРНК в геноме мыши. Таким образом, мы показали, что регуляторный потенциал X-хромосом человека и мыши на уровне генов миРНК может существенным образом различаться.

ОЛИГОПЕПТИДАЗА В ИЗ *SERRATIA PROTEAMACULANS* В ИЗУЧЕНИИ ДНК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ЯДРАХ ЭУКАРИОТ. © Г. Я. Коломийцева, Т. А. Смирнова, А. Н. Прусов, Л. П. Курочкина. НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

Сообщаем о новом подходе к изучению ДНК-белковых взаимодействий в хроматине ядер с использованием

выделенного из микроорганизма *Serratia proteamaculans* фермента олигопептидазы В (OpdB) (клан SC, семейство S9A по номенклатуре MEROPS). Фермент относится к классу психрофильных протеиназ, является специфичным к остаткам Arg и гидролизует пептиды с мол. массой ≤ 3 кДа. Мы нашли, что линкерный гистон H1 также является субстратом олигопептидазы OpdB, которая избирательно действует на различные его подфракции. При инкубации OpdB с выделенными подфракциями H1(2), H1(3), H1(4) и H1(6) из проростков пшеницы в молярном соотношении фермент/субстрат 1 : 1, при pH 8.0, температуре 25 °C в течение 6 ч по данным электрофорезов в Na-SDS-ПААГ в трис- и трициновой системах, подфракция H1(2) гидролизовалась полностью, H1(4) и H1(6) — частично, а на H1(3) фермент не действовал. Предварительные эксперименты показали, что действие OpdB на гистон H1 является тканеспецифичным и видоизменяется после модификации гистонов в составе ядер, в частности при метилировании S-аденозилметионином. Такие свойства OpdB можно объяснить как особенностями структуры гистона H1 (его трехдоменной организацией, неструктурированностью N- и C-концов), так и строением OpdB. Его пропеллерная часть, ограничивающая доступ высокополимерных белков, по-видимому, не препятствует продвижению N-концов некоторых подфракций гистона H1 к каталитическому центру фермента, но тем не менее он способен дифференцировать эти подфракции из-за различий в аминокислотных последовательностях, модификаций последовательностей или структуры. Полученные результаты позволяют предполагать, что эта олигопептидаза может оказаться чрезвычайно полезной для изучения состояния концов гистонов H1.

АНАЛИЗ ТРЕТИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ КОНДЕНСИНА В ГЕНОМЕ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. © А. С. Комиссаров,¹ П. А. Бутылин,^{1,2} А. В. Струнников,² О. И. Подгорная.¹
¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия, и ²Национальные институты здоровья (NIH/NICHD), Бетесда, США, ad3002@gmail.com.

Конденсин — белковый комплекс, который обеспечивает компактизацию хромосом в митозе у эукариот и гарантирует индивидуализацию хромосом, что необходимо для правильного распределения сестринских хроматид между дочерними клетками. Митотическая функция конденсина зависит от правильного узнавания конденсином специфических участков связывания в хромосоме. Закономерности, определяющие связывание конденсина с индивидуальными хромосомными последовательностями, остаются неизученными. В настоящей работе предпринят компьютерный анализ третичной структуры ДНК 7 ранее определенных сайтов связывания конденсина в геноме *Saccharomyces cerevisiae* (Wang et al., 2004). Участки ДНК экспериментально проанализированы с использованием модели митотической сегрегации мини-хромосом (Бутылин, Струнников, 2008). В результате определили, что индивидуальные участки связывания конденсина вносят различный вклад в обеспечение сегрегации хромосом. Возможно, эти различия определяются их структурой. Одной из целей настоящего исследования было сопоставить данные анализа третичной структуры ДНК с результатами анализа теста на митотическую сегрегацию ми-

ни-хромосом. Использование аналитического программного обеспечения позволило построить третичную модель ДНК проанализированных участков связывания конденсина (Bolshoy et al., 1991). Для построенных моделей рассчитаны характеристики кривизны. В качестве out-group выбраны последовательности ретроэлементов. Выяснилось, что все проанализированные участки имеют выраженную кривизну ДНК, напоминающую участки прикрепления к ядерному матриксу (МАР) в промоторах генов. Ретроэлементы соответствующей длины никогда не обнаруживают значительной кривизны, и их нет в связывающих конденсин участках. Кривизна фрагмента может являться одним из определяющих факторов связывания конденсина с хроматином. 7 участков связывания конденсина распадаются на 3 мотива по степени кривизны. Не удалось выявить однозначное соответствие структуры ДНК исследованных локусов и данных о митотической стабильности мини-хромосом, содержащих такие локусы. Это указывает на то, что кривизна ДНК может быть необходимым, но недостаточным условием для определения участков связывания конденсина, и его участие в митотическом расхождении таких участков определяется закономерностями строения ДНК другого порядка. Возможно, таким фактором является расположение участков терминации репликации ДНК.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ХРОМАТИНА, ИНДУЦИРОВАННЫЕ ВОЗДЕЙСТВИЕМ РАДИАЦИИ, СОПРОВОЖДАЮТ РАЗВИТИЕ ЭФФЕКТА СВИДЕТЕЛЯ В РАЗНЫХ ТИПАХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА. © М. С. Конькова, А. В. Ермаков, Т. Д. Смирнова, Л. В. Каменева, Н. Н. Вейко. Медико-генетический научный центр РАМН, Москва, mkonkova@gmail.com.

В более ранних исследованиях мы показали, что после воздействия рентгеновского излучения (10 сГр) в G₀-лимфоцитах человека происходит перемещение локусов 1q12 гомологичных хромосом от мембраны к центру ядра и активация ядрышкообразующих районов (ЯОР) хромосом; обе реакции передаются необлученным клеткам по механизму эффекта свидетеля, и фактором сигнализации являются фрагменты внеклеточной ДНК (вкДНК). Мы решили повторить подобные исследования на мезенхимных стволовых клетках человека (МСК) и раковых стволовых клетках молочной железы (РСК^{МЖ}).

Добавление вкДНК облученных МСК к клеткам-свидетелям вызывало в последних перемещение локусов гомологичных хромосом 1q12 и активацию ЯОР. Методом ПЦР нами показано, что воздействие радиации в малой дозе на МСК приводит к увеличению количества мРНК белка TLR9 и адаптерного белка MyD88. Это свидетельствует об участии рецептора TLR9, обеспечивающего взаимодействие с вкДНК посредством адаптерной молекулы MyD88, в развитии ответа на воздействие облучения. Полученные данные при оценке уровня образования двухнитевых разрывов (ДР) ДНК (γ -H2A.X-фокусы) указывают на накопление со временем ДР ДНК в МСК, гибель этих клеток по механизму апоптоза и переход в среду культивирования фрагментов вкДНК. Таким образом, мы предполагаем, что индуцируемый радиацией эффект свидетеля, развивающийся в облученных МСК и необлученных МСК-свидетелях, опосредован ДНК-сигнальным механизмом.

Метод FISH-гибридизации позволил выявить у данного донора два типа РСК^{МЖ}: одни маммосферы состояли из клеток с двумя гибридными сигналами, другие — с тремя. И так же как и у облученных G₀-лимфоцитов человека, в РСК^{МЖ} 1-го типа происходит перемещение прицентромерных локусов гомологов 1-й хромосомы из примембранной области ядра во внутреннюю и наблюдается активация ЯОР хромосом. Наблюдаемый эффект мы связываем с индукцией радиацией начального этапа развития адаптивного ответа (АО). У клеток же 2-го типа эффект воздействия радиации проявляется в стремительном уменьшении числа клеток при увеличении дозы (с 3 до 10—50 сГр). Если до облучения почти 70 % всех РСК^{МЖ} представлены клетками 2-го типа, то после воздействия ионизирующего излучения в больших дозах 70 % всех клеток — клетки 1-го типа. Также по мере увеличения дозы меняется и характер гибели РСК^{МЖ}: при воздействии радиации в адаптирующих дозах (3 и 10 сГр) гибель клеток идет по механизму апоптоза, а при экспозиции в дозе 50 сГр — по механизму некроза. Значительных различий в концентрации вкДНК после воздействия радиации мы не обнаружили, однако видно, что увеличение ее количества индуцируется рентгеновским излучением в адаптирующих дозах. Мы предполагаем, что именно РСК^{МЖ} 1-го типа будут выживать при проведении лучевой терапии и способствовать повторному росту опухоли. Блокирование в этих клетках реакции АО сможет привести к их гибели при относительно низких дозах облучения.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ ГЕНА *Xist* МЫШИ. © А. М. Короткова. Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск.

Дозовая компенсация генов, расположенных на половых хромосомах, осуществляется у высших млекопитающих за счет инактивации одной из двух X-хромосом у самок. Этот процесс контролируется особым локусом на X-хромосоме, называемым центром инактивации (Xic). Данный локус содержит ряд элементов, ответственных за подсчет, выбор будущей неактивной хромосомы и инициацию процесса инактивации. Ключевым фактором среди этих элементов является ген *Xist*, который экспрессируется со случайно выбранной X-хромосомы. Его продукт — длинная не кодирующая белок РНК — распространяется вдоль всей хромосомы, что приводит к гетерохроматизации и к транскрипционному молчанию расположенных на ней генов. В данной работе мы пытаемся выявить механизмы регуляции гена *Xist* мыши в процессе инактивации.

Регуляция гена исследовалась с помощью репортерных конструкций, основанных на векторе, содержащем ген люциферазы под контролем различных участков промоторной области *Xist* мыши. Активность конструкций была измерена в разных типах клеток самок мыши — как дифференцированных, так и недифференцированных. Результаты измерения активности репортерных конструкций выявили сходный профиль экспрессии для клеток разного типа и привели к обнаружению шести районов вероятного расположения энхансеров либо сайленсеров транскрипции.

Компьютерный анализ последовательности ДНК промотора *Xist* выявил большое количество потенциальных сайтов связывания транскрипционных факторов (ER, RAR, SRY и др.). Сопоставление результатов измерений активности конструкций и компьютерного анализа после-

довательностей показало возможное расположение участков, усиливающих либо ослабляющих экспрессию.

В высококонсервативном (среди всех млекопитающих) районе промотора был обнаружен потенциальный транскрипционный фактор ER (estrogen receptor), который является ядерным рецептором связывания стероидного гормона эстрогена. Выдвинуто предположение о том, что эстроген может принимать участие в процессе инактивации X-хромосомы за счет влияния на транскрипционную активность гена *Xist*. Для проверки этого предположения провели измерение активности репортерных конструкций, содержащих ER-сайты, в клетках, предварительно подверженных индукции эстрадиолом. Активность экспрессии оказалась почти в 2 раза выше на одной из конструкций. Проведенные эксперименты свидетельствуют в пользу модели влияния гормона на процесс инактивации в период развития эмбриона.

ИНТЕРФАЗНЫЕ ЯДРЫШКООБРАЗУЮЩИЕ РАЙОНЫ ЛИМФОЦИТОВ КОРОВ ПРИ ВИРУСЕ ЛЕЙКОЗА.
© Г. П. Косякова,¹ С. В. Иванов,² А. Ф. Яковлев.¹ ¹ВНИИ генетики и разведения с.-х. животных РАСХН, Санкт-Петербург—Пушкин, и ²С.-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ».

Выявлено, что при лейкозе в циркулирующей клеточной популяции обнаруживаются клеточные формы разной степени зрелости, некоторые из которых характеризуются атипичной морфологией, а также двуядерные клетки. При развернутой клинико-гематологической и опухолевой стадии заболевания доля клеток с атипичной морфологией значительно возрастает. Вместе с тем изучение цитоморфологических характеристик интерфазных ЯОР (ИЯОР) находится на начальной стадии. Известно, что ИЯОР — это структурно-функциональная единица ядра интерфазной клетки, в котором локализованы рибосомные гены и происходит синтез рибосомной РНК (рРНК). При опухолевом процессе может происходить изменение морфологии ИЯОР. При этом позже было установлено, что и в активно пролиферирующей, не характеризующейся злокачественными признаками клеточной популяции также могут происходить изменения морфологии ИЯОР (Derenzini et al., 1998).

Целью работы являлось изучение частоты ИЯОР клеток периферической крови коров при поражении вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС).

Как показывают результаты анализа, ИЯОР в лимфоцитах периферической крови крупного рогатого скота (коров черно-пестрой породы) представляют собой интенсивно окрашенные нитратом серебра коричневые компартменты на светло-желтом фоне ядра клетки. ИЯОР варьируют по форме, но, как правило, представляют собой округлые образования, в которых могут быть различимы интенсивные черного цвета гранулы, предположительно содержащие белки, непосредственно участвующие в экспрессии рибосомной РНК на светло-желтом фоне ядра клетки.

Результаты свидетельствуют о том, что средний показатель индекса ИЯОР у РИД-положительных животных из хозяйства «Детскосельский» составил 2.25 ± 0.105 , тогда как аналогичный показатель для животных, которые отрицательны в РИД, ИЯОР не превысил 1.73 ± 0.230 (различие достоверно при $P < 0.01$). Интересно отметить, что индекс ИЯОР для РИД-положительных животных

из хозяйства «Красная славянка» с дважды подтвержденным вирусоносительством варьировал от 2.50 до 3.86 и в среднем составил 3.155 ± 0.085 , тогда как индекс ИЯОР для группы РИД-отрицательных животных варьировал от 1.01 до 2.58 и в среднем составил 1.82 ± 0.12 (различие достоверно при $P < 0.005$). Через 1 год индекс ИЯОР, проанализированный в оставшейся группе из 10 РИД-положительных животных, уже варьировал от 3.62 до 4.62 и составил в среднем 4.22 ± 0.35 , тогда как аналогичные показатели для контрольной группы варьировали от 1.85 до 2.86, а средний индекс ИЯОР составил 2.01 ± 0.07 (различие достоверно при $P < 0.001$). Также изучали гетерогенность лимфоцитов периферической крови коров по частоте интерфазных ядрышкообразующих районов в ядре.

Особого внимания, на наш взгляд, заслуживают данные относительно анализа ИЯОР в цитологически различных субпопуляциях лимфоцитов из крови коров, положительных в РИД. Для этой цели мы отобрали 6 животных из племенного совхоза «Большевик» и 1 животное, положительное в РИД, из учхоза «Пушкинское». В крови больных животных выявлялись не только лимфоциты с округлой формой ядра, которые мы обозначаем как лимфоциты с типичной (регулярной) формой ядра, но и лимфоциты с лобулированными ядрами, с ядрами причудливой формы, которые мы обозначаем как лимфоциты с атипичной (нерегулярной) формой ядра. Следует отметить, что частота лимфоцитов с нерегулярной формой ядра в крови коров, положительных в РИД, составляла не менее 8.6 % и достигала 30.7 %.

ЭФФЕКТ НИТРОЗОДИМЕТИЛМОЧЕВИНЫ НА ЯДЕРНОЕ СОЗРЕВАНИЕ ООЦИТОВ КОРОВ IN VITRO.
© Т. И. Кузьмина, Н. О. Новикова, О. П. Маташина. ВНИИ генетики и разведения с.-х. животных РАСХН, Санкт-Петербург—Пушкин, prof.kouzmina@mail.ru.

Созревание ооцитов млекопитающих in vitro — комплексный процесс, включающий в себя преобразование хроматина и цитоплазматические изменения. Синхронизация ядерно-цитоплазматического созревания детерминирует формирование зрелой яйцеклетки, компетентной к оплодотворению и дальнейшему развитию из нее биологически полноценных эмбрионов. Исходная популяция донорских ооцитов, используемых в клеточных технологиях репродукции, гетерогенна по своему составу (Alm et al., 2005). Синхронное прохождение группой ооцитов в эксперименте завершающих этапов мейотического дозревания и снижение уровня дегенерации хроматина позволяют значительно увеличивать число биологически полноценных яйцеклеток, используемых в клеточных репродуктивных технологиях (Kimura et al., 2007). В то же время представляет интерес использование модели экстракорпорального созревания ооцитов для идентификации эффектов различных биологически активных веществ, в том числе и супермутагенов, к которым относится и нитрозодиметилмочевина (НДММ). В экспериментах использовали донорские ооциты коров, убитых на мясокомбинате. Селекцию клеток, их культивирование и оплодотворение ооцитов проводили в соответствии с методами, разработанными в лаборатории биологии развития ГНУ ВНИИГРЖ (Кузьмина и др., 2009). Базовой средой для культивирования служила ТС-199, дополненная 15 % бычьей сыворотки, в опытную добавляли НДММ в малой

10⁻⁸ г/л концентрации (Мамлеев и др., 1981). Статус хроматина ооцитов оценивали по методу Тарковского и соавторов (Tarkowski et al., 1966). Для сравнения результатов, полученных в опытных и контрольных группах, использовали критерии χ^2 с помощью статистической программы Sigma Stat. Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали при трех уровнях значимости: $P < 0.05$, $P < 0.01$ и $P < 0.001$. Хроматин ооцитов анализировали через 5, 10, 15, 20, 25, 30 и 35 ч. Всего исследовано 502 ооцита на разных стадиях мейоза (диплотена, диакинез, метафаза-I, анафаза, телофаза и метафаза-II). Исследование динамики преобразования хроматина в опытных группах показало, что уже через 10 ч культивирования 97 % ооцитов в опытной группе реинициировали мейоз, в то время как в контроле доля ооцитов, реинициировавших мейоз в этот срок, составила 54 % ($P < 0.05$). Через 15 ч культивирования 90 % ооцитов опытной группы достигли стадии метафазы-I (в контроле — 40 %, $P < 0.05$). 77 % ооцитов, созревших в среде НДММ, через 20 ч находились на стадии телофазы и лишь 5 % в контрольной группе ($P < 0.01$). От 74 до 89 % ооцитов в опытной группе достигли стадии метафазы-II в промежутках от 25 до 30 ч. НДММ обеспечивает одновременное вступление ооцитов в завершающую стадию мейоза, однако продолжительность времени прохождения каждой стадии мейоза по сравнению с контролем не нарушается. Не обнаружено достоверных различий в доле ооцитов контрольной и опытных групп с дегенерацией хроматина в динамике культивирования. При оплодотворении ооцитов выход эмбрионов на стадиях поздней морулы и бластоцисты в опытной группе составил 30 % против 19 % в контроле ($P < 0.05$).

Таким образом, выявлен стимулирующий эффект НДММ на ядерное созревание ооцитов коров *in vitro*, выразившийся в синхронизации ядерного созревания, увеличении числа зигот и доимплантационных эмбрионов, полученных из ооцитов, созревших в присутствии НДММ. Идентификация механизмов выявленных эффектов позволит проводить коррекцию мейотического дозревания ооцитов и раннего эмбрионального развития *in vitro*.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ РЕНИН-АНГИОТЕНЗИНОВОЙ СИСТЕМЫ И ФОРМИРОВАНИЕ КАРДИОЛОГИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА. © Д. В. Кулешова,¹ Р. М. Бицадзе,¹ А. Г. Обрезан,² И. М. Спивак. ¹Кафедра госпитальной терапии медицинского факультета С.-Петербургского государственного университета и ²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Изменение активности экспрессии различных генов в ядре приводит к появлению тех или иных признаков на клеточном и организменном уровнях. В функционировании организма в целом большую интегрирующую роль играет ренин-ангиотензиновая система, ключевым ферментом которой является ангиотензинпревращающий фермент (АСЕ), влияющий на проявление индивидуальных особенностей человека. Активность АСЕ ассоциирована с инсерционно-делеционным (I/D) полиморфизмом кодирующего его гена, локализованного в коротком плече 17-й хромосомы. Данный полиморфизм характеризуется наличием или отсутствием 287 пар оснований в 16-м интроне. Аллель I ассоциирована с низкой активностью

фермента, а аллель D, наоборот, с высокой, что связано с изменениями его транскрипционной активности. Другие гены ренин-ангиотензиновой системы, например ген ангиотензиногена (AGT), также существенно влияют на различные системы организма. Он локализован на длинном плече 1-й хромосомы в локусе 1q42-q43. Полиморфизм M235T, влияющий на развитие гипертензии, является одонуклеотидной заменой тимина на цитозин в 704-м положении второго экзона гена ангиотензиногена, что приводит к замене метионина на треонин в 235-м положении конечного продукта. Носители T-аллеля имеют повышенный на 15—20 % уровень ангиотензина I в крови, что и является одним из факторов риска сердечно-сосудистой патологии. Однако сама замена тимина на цитозин в 704-м положении не влияет на функцию белка. Недавно было выяснено, что ее роль объясняется сцеплением с аллельным вариантом, находящимся в промоторной области гена (-6G → A), для которого показана ассоциация с уровнем экспрессии гена.

В России 8 млн человек (5 % всего населения) страдают сахарным диабетом 2-го типа. Главными причинами смерти и преждевременной инвалидизации больных сахарным диабетом 2-го типа являются сердечно-сосудистые осложнения. Вероятна зависимость тех или иных нозологических сочетаний от генетических особенностей регуляции эндокринной и сердечно-сосудистой деятельности. Ранее была показана связь полиморфизмов генов ренин-ангиотензиновой системы с развитием сердечно-сосудистой патологии и депрессии. В нашем исследовании мы изучали влияние генетического полиморфизма генов ангиотензинпревращающего фермента АСЕ и ангиотензиногена АГТ на формирование кардиологической патологии у больных сахарным диабетом. Были обследованы 102 пациента с сахарным диабетом 2-го типа. Возраст больных в среднем составил 60.1 ± 8.43 года, длительность заболевания диабетом — 7.9 ± 7.9 года. У больных зарегистрированы следующие сопутствующие заболевания: гипертоническая болезнь — 103 (100 %), ишемическая болезнь сердца — 83 (80.5 %), острый инфаркт миокарда — 7 (6.8 %), острое нарушение мозгового кровообращения — 32 (31.1 %), хроническая сердечная недостаточность — 84 (81.5 %). В группу контроля вошли 46 пациентов с заболеваниями сердечно-сосудистой системы без диабета. У пациентов были проведены клинико-лабораторные исследования липидного спектра, уровня гликемии, С-реактивного белка, уровня мочевины, кислоты. Генотипирование проводилось методом полимеразной цепной реакции с использованием трехпраймерной системы и анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. При сравнении изученных групп пациентов достоверных различий в частотах аллелей I/D АСЕ и T/M АГТ между больными сердечно-сосудистыми заболеваниями с сахарным диабетом и без него не выявлено. Вместе с тем выявлена связь аллеля D гена АСЕ с ишемической болезнью сердца и сохраняющая роль аллеля I и генотипа II в обеих группах. Также была обнаружена корреляция «слабого» аллеля D гена АСЕ с нарушением мозгового кровообращения как у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями с сахарным диабетом 2-го типа, так и у больных без сахарного диабета, одновременно подтверждена сохраняющая роль аллеля I и генотипа II в развитии сосудистых поражений у всех обследованных больных. Таким образом, выявлена зависимость формирования клинической картины и осложнений у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями и сахарным диабетом 2-го типа от по-

лиморфизма гена *ACE*, что может учитываться в прогнозировании и лечении.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛИ(А)⁺РНК В ЯДРАХ И В ИЗОЛИРОВАННЫХ ВНУТРИЯДЕРНЫХ СТРУКТУРАХ РАСТУЩИХ ООЦИТОВ ПТИЦ МЕТОДАМИ 3D-FISH, 2D-FISH И ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ IN SITU. © Т. В. Куликова, С. Е. Дерюшева, А. М. Злотина, Е. Р. Гагинская. С.-Петербургский государственный университет, spbchomas@gmail.com.

Большинство полиаденилированных транскриптов вскоре после синтеза экспортируется в цитоплазму, однако существует пул удерживаемых в ядре поли(А)⁺РНК. Удержание и накопление в ядре пре-мРНК могут регулировать экспрессию кодируемых ими белков. Так, в ядерных доменах параспеклах накапливаются длинные транскрипты, содержащиеся в своем составе мРНК, которые удерживаются в этих органеллах за счет взаимодействия белков параспеклов с гиперредактированными участками этих транскриптов (Prasanth et al., 2005). Внутри ядра также локализуются поли(А)⁺РНК, не кодирующие белки, которые могут играть структурную роль в формировании ядерных доменов. Например, белки параспеклов интегрируются в обособленный домен с помощью длинной некодирующей РНК NEAT1 (Bond, Fox, 2009). Транскрипционно активные ядра растущих ооцитов представляют особый интерес как для изучения принципов организации ядерных доменов, накапливающих поли(А)⁺РНК, так и для исследования особенностей их функционирования в оогенезе.

Для идентификации ядерных доменов, накапливающих поли(А)⁺РНК, мы адаптировали метод 3D-FISH к целым ооцитам курицы и голубя. В качестве зонда использовали олигонуклеотид dT₃₀, меченный флуорохромом Су3. Яркий гибридационный сигнал равномерно распределялся по всей нуклеоплазме ооцитов, при этом оси хромосом типа ламповых щеток (ЛЩ), РНП-матрикс боковых петель хромосом и центромерные белковые тела не флуоресцировали. На фоне нуклеоплазмы выделялись менее интенсивно флуоресцирующие структуры, находящиеся у терминальных районов ЛЩ. Судя по форме и расположению этих структур относительно хромосом, они соответствовали особым (гигантским терминальным и интерстициальным глыбчатым) петлям. Дополнительно к визуальной оценке распределение интенсивности флуоресценции в различных структурах ядра и нуклеоплазме оценивали с помощью инструментов программы LAS AF (Leica Microsystems GmbH).

Для детальной характеристики распределения поли(А)⁺РНК в индивидуальных структурах ядра ооцита мы использовали препараты спредированного содержимого изолированных ядер ооцитов (препараты хромосом ЛЩ) курицы и голубя. Для выявления поли(А)⁺РНК применяли ДНК/РНК FISH с биотинилированным по 5'-концу олигонуклеотидом (dT)₃₀ в качестве зонда. Как и после 3D-FISH, в хромомерах ЛЩ, а также в РНП-матриксе простых боковых петель, где находятся транскрипты в процессе синтеза, флуоресцентный сигнал отсутствовал. При этом особые петли ЛЩ интенсивно флуоресцировали. Гибридационные сигналы были чувствительны к обработке препаратов нуклеазой S7, но не к обработке РНКазой А, что характеризовало последовательности-ми-

шени как 3'-поли(А)-«хвосты» РНК. В то же время, поскольку известно, что белки гетерогенных ядерных РНП могут специфично связывать гомонуклеотидные олигонуклеотиды (Solovei et al., 1995), такие как использованный нами зонд олиго(dT)₃₀-bio, мы не могли исключить, что флуоресцентный сигнал был обусловлен связыванием зонда с белком, который диссоциировал после переваривания нуклеазой поли(А)-«хвостов» РНК. Достоверность гибридизации олигонуклеотида с РНК удалось подтвердить, применив обратную транскрипцию in situ (ISRT) с олиго(dT)₃₀ в качестве праймера. На первом этапе ISRT биотинилированный с 5'-конца праймер олиго(dT)₃₀ гибридизовали с мишенью на препарате в условиях, аналогичных FISH. На втором этапе препараты инкубировали в смеси, содержащей обратную транскриптазу и меченый нуклеотид (dUTP-dig). Затем детектировали оба меченых нуклеотида (биотин на 5'-конце праймера и дигоксигенин в составе нити, надстроенной обратной транскриптазой). Распределение флуоресцентных сигналов после FISH и ISRT было сходным. Таким образом, мы достоверно показали, что особые петли, формирующиеся в определенных локусах хромосом типа ЛЩ, содержат поли(А)⁺РНК. Хотя концентрация поли(А)⁺РНК в особых петлях ниже, чем в нуклеоплазме, сравнение распределения поли(А)⁺РНК в трехмерном пространстве интактного ядра и в изолированных структурах ядра позволяет рассматривать особые петли на ЛЩ птиц как специализированные домены, содержащие полиаденилированные РНК, происхождение и судьба которых остаются невыясненными.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-01328а), в рамках проекта НШ-3299-2010.04 и при технической поддержке ЦКП «ХРОМАС» С.-Петербургского государственного университета.

ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ ПРОГЕРИНА НА ХАРАКТЕР ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ХРОМАТИНА С ЯДЕРНОЙ ОБОЛОЧКОЙ. © С. Курчаинова. НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

Прогерин — мутантная форма ламина А, экспрессия которой в результате возникновения *de novo* мутации является причиной развития прогерии Хатчинсона—Джилфорда (De Sandre-Giovannoli et al., 2003; Eriksson et al., 2003). В отличие от нормального ламина А, созревание которого включает в себя серию посттрансляционных модификаций, финальная стадия созревания прогерина нарушена из-за делеции сайта расщепления специфически металлопротеазами. Молекулярные механизмы, связывающие экспрессию прогерина с развитием симптомов ускоренного старения, в настоящий момент недостаточно исследованы. В частности, предполагается, что прогерин оказывает влияние на характер взаимодействия хроматина с ядерной оболочкой, что приводит к нарушению эпигенетической регуляции, важным фактором которой является специфическое позиционирование генов в интерфазном ядре (Goldman et al., 2004).

В настоящей работе мы исследовали влияние прогерина на характер взаимодействия хроматина с ядерной оболочкой и динамику установления этих взаимодействий при постмитотической реконструкции ядерной обо-

лочки в клетках, трансфицированных плазмидой, кодирующей прогерин-GFP (Scaffidi, Misteli, 2005). Экспрессия прогерина вызывает типичные для прогерии Хатчисона—Джилфорда изменения формы ядер с формированием лобулярных ядер и многочисленных инвагинаций ядерной оболочки. Данный эффект сопровождается исчезновением эпигенетических меток, характерных для неактивного гетерохроматического состояния хроматина (НЗК27-Ме3 и НЗК9-Ме3). Однако это не коррелирует с изменением структурного состояния (деконденсацией) хроматина. Напротив, наблюдаются как перераспределение периферического гетерохроматина внутрь ядра, так и компактизация эухроматиновых районов. Таким образом, экспрессия прогерина приводит к нарушению координации различных уровней эпигенетической регуляции — посттрансляционных модификаций гистонов, высших уровней компактизации хроматина и 3D-организации генома.

Также мы исследовали участие прогерина в постмитотической реконструкции ядерной оболочки, индуцированной гипотоническим воздействием (Владимирская и др., 1999), что позволяет значительно растянуть процесс формирования ядерной оболочки во времени. Прогерин в целом повторяет распределение ламина А, однако в цитоплазме интерфазных и митотических клеток выявляются ярко светящиеся гранулы, в состав которых входит прогерин. В ходе нормального митоза поведение ламина А и прогерина практически совпадает. Однако при гипотоническом воздействии на митотические клетки выявляются различия в динамике ассоциации этих белков с хромосомами: ламин А связывается с деконденсированными хромосомами уже через 5 мин после начала воздействия, а прогерин полностью остается в цитоплазме. На более поздних стадиях реконструкции ядерной оболочки обнаруживается также неполная колокализация ламина А и прогерина. Можно предположить, что индивидуальные участки хромосом обладают различным аффинитетом к прогерину и ламину А.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-01352-а).

СТРОЕНИЕ ИНТЕРФАЗНЫХ ЯДЕР В КУЛЬТУРЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА.
© А. В. Лавров, Я. И. Вольдгорн. Медико-генетический научный центр РАМН, Москва, avlavrov@yandex.ru.

Пространственная организация хроматина в интерфазном ядре является эпигенетическим механизмом регуляции активности генома. Взаимное расположение хромосомных территорий в интерфазном ядре является уникальной и стабильной характеристикой различных типов клеток человека — как дифференцированных, так и эмбриональных и взрослых стволовых. Культуры мезенхимных стволовых клеток (МСК) человека, используемые в том числе в регенеративной медицине, представляют собой гетерогенные популяции клеток, мало изученных с точки зрения строения интерфазного ядра. В нашей работе приводятся данные о строении ядер в культуре МСК человека с учетом их гетерогенности по размеру ядра.

МСК получены из стромально-васкулярной фракции жировой ткани и костного мозга человека — наиболее распространенных источников МСК. Визуализацию цент-

ромерных областей хромосом 6, 8 и 18 проводили с помощью FISH, используя CEP-зонды (Vysis). Было проанализировано 5 культур МСК от 19 до 52 ядер в каждой культуре. При анализе изображений ядер определяли площадь ядра в пикселях, а также радиальные расстояния сигналов центромерных зондов.

Распределения радиальных расстояний и размеров ядра отклонялись от нормальных распределений. Не было обнаружено различий в положении соответствующих хромосом в различных культурах. Медианы радиальных расстояний центромер 6, 8 и 18 составили 0.69, 0.67 и 0.49 соответственно. Центромера 18 лежала на меньшем расстоянии, чем центромеры 6 и 8 ($P < 0.001$, критерий Колмогорова—Смирнова). Размер ядер как в культурах, так и между культурами колебался в большом диапазоне (медианы от 27 089 до 49 411 в разных культурах). При этом в каждой культуре наблюдалось большинство клеток малого и среднего размеров и ~25 % клеток большого размера. Различий положения центромер в зависимости от размера ядра выявлено не было, за исключением одной культуры, в которой было показано, что один из гомологов хромосомы 6 лежит ближе к центру в меньших по размеру ядрах (0.5 против 0.65; $P < 0.05$). При анализе гомологичных хромосом было обнаружено, что один из гомологов каждой хромосомы всегда находится существенно ближе к центру ядра, чем другой ($P \sim 0.001$). Данное правило соблюдалось для всех изученных хромосом и во всех культурах. Отдельного внимания заслуживает тот факт, что дистальный гомолог хромосомы 18 находился на том же расстоянии, что и проксимальный гомолог хромосом 6 и 8 (0.6—0.67, 0.53—0.64 и 0.54—0.57 соответственно). Дальнейшее изучение строения интерфазных ядер в культуре МСК на разных сроках и при дифференцировке позволит уточнить особенности и изменения положения хромосомных территорий в стволовых и дифференцированных клетках и приблизиться к пониманию механизмов эпигенетической регуляции активности генома и поддержания стволовых свойств с помощью ремоделирования объемной структуры хроматина.

ВЛИЯНИЕ СТАТУСА МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК НА СТРУКТУРНУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ РИБОНУКЛЕОПРОТЕИНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ ЯДЕР МЕРИСТЕМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ПШЕНИЦЫ *TRITICUM AESTIVUM* L.
© Е. М. Лазарева,¹ Е. Н. Баранова,² В. Ю. Поляков.³ ¹Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, ²ВНИИСБ РАСХН, Москва, и ³НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

В работе изучено влияние аналога основания ДНК 5-азацитидина на структурную организацию ядерных компартментов, содержащих РНК (ядрышки, ядерные РНП-тельца и структуры, условно обозначенные как микропуффы). Известно, что одним из показателей изменения статуса метилирования генома является активация генов, кодирующих синтез рибосомной РНК. В частности, показано, что после корепликативного включения 5-азацитидина в ДНК у некоторых представителей *Brassica* и у *Arabidopsis* наблюдается активация латентных организаторов ядрышка. Нами подобраны условия (возраст проростков, концентрация 5-азацитидина и время инкубации), при которых в клетках меристемы корня гексаплоидной

пшеницы *Triticum aestivum* активируются латентные организаторы ядрышек в хромосомах 1А и 5Д. Основываясь на данных литературы, мы рассматриваем активацию латентных организаторов ядрышка в клетках пшеницы как показатель, характеризующий индуцированное 5-азациитидином гипометилирование генома. Прямым следствием изменения статуса метилирования можно считать увеличением размеров ядрышек, связанное со значительным увеличением доли гранулярного компонента, и появление в кариоплазме ядер аргентофильных структур различного размера и формы. Для ультраструктурной характеристики ядрышек и аргентофильных комплексов проведено изучение клеток меристемы после обработки 5-азациитидином методом электронной микроскопии в сочетании с техникой, выявляющей на ультратонких срезах РНК. Идентифицированные этими методами комплексы по характерной морфологии можно разделить на 3 группы: 1) скопления фибриллярных РНП-частиц в виде коротких трубочек толщиной около 30—40 нм; 2) овальные структуры, состоящие из анастомозирующих фибрилл, обогащенных гранулами (микроядрышки); 3) фибриллярные комплексы, представленные тонкими фибриллами, отходящими от конденсированного хроматина (пуффы). Аналогичные структуры можно наблюдать в ядрах контрольных клеток, однако в ограниченном количестве и не во всех ядрах. Как показывает ингибиторный анализ, после обработки проростков актиномицином Д наблюдаются резкое изменение морфологии ядрышек (частичная потеря гранулярного компонента, появление в центральной области декомпактизованного хроматина) и контракция РНП-комплексов 2-го и 3-го типов. Полученные данные обсуждаются в рамках гипотезы о нескольких типах организации транскрипционно активных локусов хромосом.

РОЛЬ ЯДЕРНОЙ МЕМБРАНЫ В ПЕРЕДАЧЕ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ИНФОРМАЦИИ У РАСТЕНИЙ (НА ПРИМЕРЕ *BETA VULGARIS* L.). © Е. В. Левитес, С. С. Кирикович. Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, levites@bionet.nsc.ru.

В сформировавшихся к настоящему времени представлениях о возможных механизмах эпигенетической изменчивости большая роль отводится взаимодействию хромосом с ядерной мембраной и ядерным матриксом. Согласно гипотезе о многомерности кодирования наследственной информации у растений, ядерная мембрана и ядерный матрикс участвуют в детерминации генотипа клетки, вступающей в эмбриогенез (Levites, 2005, 2007). Из этой гипотезы следует, что воздействие на ядерную мембрану может привести не только к изменению экспрессии генов, но и к проявлению эффекта воздействия в следующих поколениях. Действительно, было показано, что прорастание семян сахарной свеклы на среде, содержащей детергент Тритон Х-100 (ТХ-100), приводит к изменению динамики прорастания семян и к последующему изменению морфологических признаков листа и корня растения (Кирикович, Левитес, 2009). Для дальнейшей проверки этой гипотезы была проведена оценка влияния детергента ТХ-100, способного нарушать связь хромосом с ядерной мембраной, на экспрессию ферментного гена *Gpi2*, контролирующего глюкософосфатизомеразу (*GPI2*).

Опытные растения выращивали из семян сахарной свеклы, прошедших замачивание в 0.1%-ном растворе ТХ-100 в течение 18 ч при 29 °С. Контрольные растения

проращивали на воде. От контрольных и опытных растений, гомозиготных по аллелю *Gpi2-S*, в 2009 г. были получены семена путем саморепродукции (под бязевыми изоляторами). Из 73 семян контрольной группы 72 семени имели стандартный фенотип SS, а 1 семя имело модифицированный фенотип с изоферментами, имеющими более медленную электрофоретическую подвижность. В опытной партии из 100 проанализированных семян 15 имели аналогичный модифицированный фенотип. Выявленные различия между опытной и контрольной партиями семян достоверны; величина G-критерия составила 9.9652 ($P < 0.01$). Эти различия указывают на то, что изменения, вызываемые у растений под воздействием ТХ-100, передаются в следующее поколение. Способность ТХ-100 нарушать связь белков с мембранами и вызывать изменения в функционировании мембран позволяет предположить, что в данном случае мишенью для ТХ-100 могли быть ядерные мембраны и соответственно организация хромосомных участков, взаимодействующих с ядерной мембраной. Сохранение эффекта воздействия в следующем поколении указывает на то, что ядерная мембрана вносит свой вклад в передачу наследственной информации.

Таким образом, эффект воздействия неионного детергента ТХ-100 на растения сахарной свеклы может передаваться в следующее поколение и проявляться как изменение экспрессии ферментного локуса *Gpi2*, появление модифицированных изоферментных спектров *GPI2*. Проявление эффекта воздействия ТХ-100 в последующем поколении указывает на роль ядерной мембраны в передаче наследственной информации.

Работа финансировалась грантом № 99 по интеграционному проекту СО РАН 2009—2011 гг.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫЙ ХАРАКТЕР РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АЦЕТИЛИРОВАННЫХ ПО ГИСТОНУ H3 И ОБОГАЩЕННЫХ 5-МЕТИЛЦИТОЗИНОМ РАЙОНОВ ВДОЛЬ ПЛЕЧ МЕТАФАЗНЫХ ХРОМОСОМ ЧЕЛОВЕКА. © Ю. Г. Лежнина,¹ О. А. Ефимова,^{1–3} А. А. Пендина,^{2,3} Т. В. Кузнецова.^{2,3} ¹Кафедра генетики и селекции А.-Петербургского государственного университета, ²НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта СЗО РАМН и ³Диагностический (Медико-генетический центр), Санкт-Петербург, avesfly@mail.ru.

Эпигенетическим модификациям, основными из которых являются метилирование ДНК и модификации гистонов, принадлежит значительная роль в формировании структурно-функционального статуса хроматина. В настоящей работе был проведен сравнительный анализ распределения ацетилизованного по лизину в положении 9 гистона H3 (AcH3K9) и метилированной ДНК вдоль плеч метафазных хромосомах человека. Материалом исследования были препараты хромосом, полученные из ФГА-стимулированных лимфоцитов периферической крови 5 взрослых индивидов человека. Участки, обогащенные AcH3K9, визуализировали на фрагментах 60 метафазных пластинок с помощью моноклональных антител (Abcam, США). Гомологи идентифицировали после окрашивания DAPI. Установлено, что иммунофлуоресцентные сигналы, соответствующие расположению AcH3K9, неравномерно распределены вдоль плеч хромосом с преимущественной локализацией в отдельных сегментах.

Сильный флуоресцентный сигнал, свидетельствующий о высоком уровне ацетилирования, зарегистрирован в 32 R-сегментах. Сигналы средней и слабой интенсивности, соответствующие невысокому уровню ацетилирования, зарегистрированы в 86 R-сегментах. Все G-сегменты характеризовались слабой флуоресценцией, свидетельствующей о низком уровне ацетилирования. В блоках прицентромерного гетерохроматина хромосом 1, 9, 16, а также в блоке гетерохроматина хромосомы Y сигнал не был выявлен, что указывало на отсутствие в них AcH3K9. Анализ статуса метилирования ДНК различно ацетилированных участков хроматина показал, что неацетилированные участки конститутивного гетерохроматина характеризовались гиперметилированным состоянием. Среди 86 R-сегментов со средней и слабой степенью ацетилирования 6 сегментов были гипометилированы, в 48 сегментах наблюдался средний уровень метилирования, а 32 сегмента характеризовались гиперметилированным состоянием. В гиперацетилированных сегментах уровень метилирования ДНК варьировал от высокого в 17 и среднего в 12 сегментах до низкого в 3 сегментах — 1p13, 2q31 и 2q33. Именно гипометилирование ДНК наряду с гиперацетилированным состоянием хроматина последних может свидетельствовать об их особой структурно-функциональной роли и специфичной активности в лимфоцитах. Таким образом, анализ взаиморасположения эпигенетических маркеров — ацетилированного гистона AcH3K9 и метилированной ДНК — свидетельствует о сегментоспецифичности распределения активных и инактивированных районов хроматина вдоль плеч хромосом.

ПАТТЕРН РАСПРЕДЕЛЕНИЯ СТРУКТУР ХРОМАТИНА В МАКРОНУКЛЕУСАХ ИНФУЗОРИЙ В РАЗНОМ ФУНКЦИОНАЛЬНОМ СОСТОЯНИИ. © О. Г. Леонова,¹ Б. П. Караджян,² Ю. Л. Иванова,¹ Ю. Ф. Ивлев,³ В. И. Попенко.¹ ¹ Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, ² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и ³ Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН, Москва, ropen-ko@eimb.ru.

В ядрах клеток млекопитающих молчащие и активно транскрибируемые гены находятся соответственно в участках расположения компактного (гетерохроматина) и частично или полностью декомпактизованного эухроматина, причем расположение генов в ядре пространственно упорядочено в соответствии с принципом «хромосомных территорий». Инфузории содержат ядра двух типов: транскрипционно неактивные генеративные ядра — микронуклеусы и соматические ядра — макронуклеусы (МА), обеспечивающие все основные процессы функционирования клетки. Геном соматических ядер инфузორий в отличие от высших эукариот представлен короткими молекулами ДНК или субхромосомного размера — минихромосомами (100—1000 т. п. н.), или генного размера — нанохромосомами (5—20 т. п. н.). Хотя данных о пространственной организации инфузороидов мало, они позволяют предполагать существование строго упорядоченного расположения структур хроматина в пространстве МА. Так, окрашенные по Фельгену МА инфузороиды *Bursaria truncatella* имели паттерны окрашивания, специфичные для разных фаз клеточного цикла (Ruthmann, Heckmann, 1961).

В нашей работе с помощью конфокальной микроскопии (Leica TCS SP5) получены паттерны распределения

структур хроматина в соматических ядрах в разных функциональных состояниях и построены модели хроматина в разных участках МА с помощью трехмерной реконструкции на основе серийных ультратонких срезов. 3D-модели, построенные с помощью разработанной нами программы STERM (Леонова и др., 2003), существенно изменили и дополнили представления, полученные ранее на основе стандартных методов оптической микроскопии и одиночных срезов.

В инфузориях с нанохромосомами хроматин может быть организован в хроматиновые тельца размером 0.1—0.2 мкм (*Stylonychia pustulata* и *Euplotes*) (Murti, Prescott, 2002) или иметь вид тяжей, занимающих почти весь МА (*Stylonychia* sp.), за исключением периферической зоны. В интерфазных МА изучавшихся инфузороидов с субхромосомной ДНК (*D. nasutum*, *P. aurelia* и *B. truncatella*) хроматин организован в тельца 0.1—0.2 мкм. Однако под действием бивалентных катионов одиночные хроматиновые тельца объединяются в толстые тяжи типа хромонем, заполняющие весь МА. Похожий процесс наблюдается и *in vivo* при снижении активности клеток при голодании и инцистировании. В последнем случае этот процесс может происходить кооперативно в избирательных участках МА. Полученные нами данные позволяют полагать, что во всех изученных типах инфузороидов хроматин организован по одному общему принципу: теломерные концы молекул ДНК прикрепляются к организующим центрам хроматиновых структур, образуя петельные розетки хроматиновых телец или протяженные хромонемоподобные тяжи.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-17731а).

Список литературы

- Леонова О. Г. и др. 2003. Докл. РАН. 391 : 403—406.
Murti K. G., Prescott D. M. 2002. Chromosome Res. 10 : 165—173.
Ruthmann A., Heckmann K. 1961. Arch. Protistenkd. 105 : 313—340.

ЯДЕРНЫЙ БЕЛКОВЫЙ МАТРИКС ГИГАНТСКИХ ЯДЕР *CHIRONOMUS PLUMOSUS* ОПРЕДЕЛЯЕТ СТРОЕНИЕ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ. © М. С. Макаров, Ю. С. Ченцов. Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, mcsimmc@yandex.ru, yuchentsov@mail.ru.

Гигантские ядра слюнных желез *Chironomus plumosus* подвергались *in situ* процедуре по выявлению ядерного белкового матрикса (ЯБМ), которая включает в себя обработку детергентом (1%-ный Тритон X-100), удаление гистонов 2 М NaCl и обработку нуклеазами. Было показано, что предварительная обработка выделенных желез 2 мМ CuCl₂ стабилизирует структуру политенной хромосомы, делая ее устойчивой к изменению ионной силы раствора. После удаления гистонов и ДНК тело политенной хромосомы сохраняет свою морфологическую целостность и дисковый рисунок, который можно выявить как под световым, так и под электронным микроскопом. При этом в кариоплазме ядра не выявляются никаких межхромосомных фибриллярно-гранулярных структур, за ис-

ключением периферической ламины, которая с помощью антител к ламину В1 выявляется на всех стадиях обработки слюнных желез. Методом иммуноцитохимии удалось выявить в составе ЯБМ политенных хромосом мажорные негистоновые белки (топоизомеразу $\text{P}\alpha$ и SMC 1), а окраска акридиновым оранжевым показывает присутствие в ЯБМ политенных хромосом РНК-компонентов. Кроме того, в гигантских ядрах личинок ранних стадий наблюдается включение BrDU в политенные хромосомы, показывая участки синтеза ДНК, которое также выявляется в составе ЯБМ. В личинках второго и последующего возрастов метка BrDU не выявляется ни в исходных хромосомах, ни в составе ЯБМ.

Таким образом, ЯБМ гигантских ядер *Ch. plumosus* обладает всеми свойствами ЯБМ обычных интерфазных ядер и при этом определяет специфическую структуру политенной хромосомы.

КОМПОНЕНТЫ ЯДЕРНОГО БЕЛКОВОГО МАТРИКСА В СОСТАВЕ МИТОТИЧЕСКИХ ХРОМОСОМ КЛЕТОК КУЛЬТУРЫ СПЭВ. © М. С. Макаров, Ю. С. Ченцов, В. В. Бураков. Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, mcsimmc@yandex.ru, yuchentsov@mail.ru.

В работе исследовалась роль негистоновых белков, входящих в состав ядерного белкового матрикса (ЯБМ), в организации митотических хромосом культуры СПЭВ *in situ*. ЯБМ — остаточная структура, которая выявляется после обработки клеток детергентом (1%-ный Тритон X-100), 2 М NaCl и нуклеазами, причем известно, что присутствие двухвалентных катионов делает картину ЯБМ более выраженной (стабилизированной). Для стабилизации компонентов ЯБМ в составе митотических хромосом использовался 2 мМ раствор CuCl_2 . Было показано, что морфология хромосом, стабилизированных 2 мМ CuCl_2 , не отличается от исходных хромосом как под фазовым контрастом, так и при окрашивании бриллиантовым синим. Эти данные подтверждаются при иммуноцитохимическом выявлении мажорных негистоновых белков (топоизомеразы $\text{P}\alpha$ и SMC 1) в составе митотической хромосомы, при этом окраска не имеет осевого (центрального) расположения, а равномерно распределена по телу хромосомы. Подобное расположение топоизомеразы $\text{P}\alpha$ и SMC 1 сохраняется в хромосоме и после суммарной обработки клеток детергентом, 2М NaCl и нуклеазами в присутствии 2 мМ CuCl_2 , т. е. когда тело хромосомы образовано одними негистоновыми белками.

Применение предварительной стабилизации негистоновых компонентов позволяет выявить митотическую хромосому *in situ* на фазовом контрасте, при гистологическом и иммуноцитохимическом окрашивании, а также под электронным микроскопом. С помощью метода электронной микроскопии можно видеть, что *in situ* стабилизированные хромосомы практически не отличаются от исходных (за исключением небольшого уплотнения хроматинового материала), а хромосомы, подвергшиеся действию 2 М NaCl и нуклеаз, сохраняют морфологическую обособленность и образованы сетью негистоновых белков, лишенной внутри осевого компонента. При этом ЯБМ интерфазных клеток имеет классический вид: в ядрах отчетливо видны периферическая ламина, остаточное ядрышко и внутренняя фибриллярная сеть.

ВИДОСПЕЦИФИЧНОСТЬ САТЕЛЛИТОВ РОДА *MUS*. © А. А. Марк,¹ Д. С. Остромышенский,¹ И. С. Кузнецова.² ¹С.-Петербургский государственный политехнический университет и ²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Центромерный (ЦЕН) и перицентромерный (пери-ЦЕН) районы высших млекопитающих, в частности грызунов, состоят в значительной мере из сателлитной ДНК (сатДНК) и высокоповторенных танденных повторов. Общепринятым является мнение о видоспецифичности сатДНК. Однако утверждение основывается на отсутствии сходства при выравнивании между сатДНК, скажем, человека и мыши или мыши и крысы, т. е. весьма далеких видов. Данные же о сатДНК разных видов внутри одного рода в литературе отсутствуют. Задачей настоящей работы являлось сравнение сатДНК мышевидных грызунов, а затем сатДНК внутри рода *Mus*. Коммерчески доступная пан-центромерная (пан-ЦЕН) проба при флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) окрашивает ЦЕН *Mus musculus*, но расположена по плечам большинства хромосом 6 видов мышей надрода *Mus*. Мы решили ограничиться изучением только рода *Mus*, из которого доступны 3 вида — *M. musculus*, *M. spicilegus* и *M. caroli*. Для первого из них известны 4 сатДНК: АТ-богатые — минорный сателлит (МиСат, ЦЕН, ~1 % генома) и мажорный сателлит (МаСат, периЦЕН, ~8 %); ГЦ-богатые — MS3 (ЦЕН, ~1 %) и MS4 (периЦЕН, ~2 %) (Kuznetsova et al., 2005, 2006). Для *M. caroli* описаны 2 другие сатДНК, отличные от всех сатДНК *M. musculus* (Kipling et al., 1995). Все 4 сатДНК *M. musculus* при FISH на метафазных хромосомах 5 видов мышей давали такую же картину, как и проба пан-ЦЕН. Единственным исключением оказался вид *M. spicilegus*, где визуальнo пробы располагались так же, как у *M. musculus*. Для того чтобы точнее определить взаимное расположение разных сатДНК, использовали рестриктивный анализ, ПЦР на соответствующих праймерах и блот-гибридизацию по Саузерну.

Предварительные данные позволяют думать, что *M. musculus* и *M. spicilegus* обладают сходным набором сатДНК в сходных ориентациях, а сатДНК *M. caroli* отличается от обоих видов. Мажорные при рестриктивном анализе зоны в геноме *M. caroli* находятся в процессе клонирования, и предполагается после секвенирования использовать их для FISH и создания праймеров. Таким образом, утверждение о видоспецифичности сатДНК не всегда является справедливым, по крайней мере внутри рода *Mus*.

Список литературы

- Kipling D., Mitchell A. R., Masumoto H., Wilson H. E., Nicol L., Cooke H. J. 1995. CENP-B binds a novel centromeric sequence in the Asian mouse *Mus caroli*. *Mol. Cell Biol.*
- Kuznetsova I. S., Prusov A. N., Erukashvily N. I., Podgornaya O. I. 2005. New types of mouse centromeric satellite DNAs. *Chromosome Res.*
- Kuznetsova I. S., Voronin A. P., Podgornaya O. I. 2006. Telomere and TRF2/MTBP localization in respect to satellite DNA during the cell cycle of mouse cell line L929. *Rejuvenation Res.*

ЛИПИДЫ ЯДЕРНЫХ ФРАКЦИЙ НЕЙРОНОВ И ГЛИИ НЕОКОРТЕКСА В НОРМЕ И ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НА КРЫС ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ И ИСКУССТВЕННОГО ГИПОБИОЗА. © Л. Н. Маркевич, О. В. Быко-

ва, И. К. Коломийцева. Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Московская обл.

Липиды ядер нервных клеток мало изучены. Исследовали липидный состав ядерных фракций нейронов и глии в сравнении с липидным составом ткани неокортекса крыс в норме и после охлаждения крыс в условиях гипоксии/гиперкапнии до состояния искусственного гипобиоза и те же показатели через 2 ч после воздействия рентгеновского излучения на голову крыс в дозе 200 Гр. Ядра выделяли по методу Томпсона в модификации (Baker, Chang, 1980); липиды разделяли методом ТСХ и определяли индивидуальные фосфолипиды и нейтральные липиды стандартными методами. В норме липидный состав ядерных фракций нейронов и глии отличается от липидного состава ткани неокортекса крыс уменьшенным почти в 5 раз содержанием фосфолипидов и холестерина и обогащением примерно в 5 раз жирными кислотами, моно- и диглицеридами. По соотношению белок/липид в ядерных фракциях неокортекса доля белка примерно в 4 раза больше, чем в ткани и микросомальной фракции неокортекса. Эти соотношения специфичны для клеток головного мозга, тогда как в печени и тимусе соотношения липид/белок ядерной фракции близки к таковым для ткани. Крыс вводили в состояние искусственного гипобиоза методом «закрытого сосуда» по Джая (Игнатъев и др., 2006) при охлаждении тела до 14.4—17.5 °С. После возвращения к нормотермии животные не испытывали отклонения от нормы. Липидный состав неокортекса крыс в состоянии искусственного гипобиоза не изменялся. Во фракции ядер нейронов возрастало соотношение холестерин/фосфолипиды, М/М, во фракции ядер глии росло количество сфингомиелина и холестерина. Из анализа соотношений фосфатидилхолин/сфингомиелин и отсутствия изменений количества диглицеридов с большой вероятностью следует, что возрастание количества сфингомиелина обусловлено подавлением активности сфингомиелиназы. Рост количества холестерина, сфингомиелина и увеличение соотношения холестерин/фосфолипиды можно рассматривать как свидетельство активации метаболизма ядер нейронов и глии неокортекса крыс в условиях искусственного гипобиоза.

Локальное облучение головы крыс в дозе 200 Гр при экранировании туловища свинцом проводили на рентгеновской установке РУТ-250-15-1. Такая доза облучения вызывает морфологические изменения в нейронах и проявление лучевого ЦНС-синдрома у крыс. Через 2 ч после облучения забирали ткань неокортекса и выделяли ядра нейронов и глии. В ткани неокортекса после облучения происходили глубокие изменения липидного состава: рост количества сфингомиелина, падение количества фосфатидилинозитола, рост жирных кислот и диглицеридов. Падение количества фосфатидилинозитола, рост количества диглицеридов и жирных кислот укладываются в представление о лучевой активации фосфолипаз в ткани неокортекса. В ядерной фракции нейронов изменения липидного состава состояли в росте количества сфингомиелина, однако не происходило изменений количества фосфатидилинозитола, жирных кислот и диглицеридов. В ядерной фракции глиальных клеток резко падало количество фосфатидилинозитола, однако количество других липидов не изменялось. Изменения липидного состава ядерных фракций нейронов и глии при лучевом поражении отличны от изменений липидного состава ткани неокортекса и специфичны у нейронов и глии. Таким обра-

зом, показана специфичность изменений липидного состава ядерных фракций нейронов и глии неокортекса при воздействии на организм повреждающих агентов.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ ЭКСПРЕССИИ НУКЛЕОСТЕМИНА В ЯДРАХ КЛЕТОК СЕТЧАТКИ ЧЕЛОВЕКА В ХОДЕ ПРЕНАТАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ. © Ю. В. Маркитантова, Ю. А. Смирнова, Р. Д. Зиновьева. Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, yuliya.mark@gmail.com.

Нуклеостемин (GNL3) — один из белков, роль которых связана с функционированием ядра. Высокий уровень экспрессии нуклеостемина выявлен в эмбриональных, нейральных стволовых клетках, в некоторых линиях раковых клеток млекопитающих и считается одним из маркеров малодифференцированных клеток (Tsai, McKay, 2002; Beekman et al., 2006 <http://jcs.biologists.org/cgi/content/full/121/24/4037-REF1>). Показано, что GNL3 обладает GTP-связывающей активностью (Tsai, McKay, 2005), принимает участие в регуляции клеточного цикла и апоптоза (Ma, Pederson, 2008 <http://jcs.biologists.org/cgi/content/full/121/24/4037-REF19>; Meng et al., 2008). Нуклеостемин участвует в обеспечении стабильности архитектуры ядра, биогенезе рибосом и в интеграции ядрышковых РНК. Ядрышковые РНК в комплексе с белками ядрышка осуществляют модификацию нуклеотидов рРНК: метилирование рибозы по -ОН и псевдоуридилирование рРНК. Нуклеостемин необходим также для функционирования теломерного комплекса в процессе деления клетки (Romanova et al., 2009).

Задача настоящей работы состоит в исследовании роли нуклеостемина в молекулярных механизмах контроля пролиферации и дифференцировки клеток сетчатки человека с 10.5 по 31 нед пренатального развития. Анализ экспрессии нуклеостемина проводили методами РТ-ПЦР и иммуногистохимии. Получены данные, характеризующие динамику экспрессии нуклеостемина в развивающейся сетчатке человека. На протяжении исследуемого периода развития в сетчатке были выявлены пространственно-временные изменения в локализации нуклеостемина. На 10.5—12.5 нед развития, характеризующихся активной пролиферацией клеток, нуклеостемин был обнаружен практически во всех клетках сетчатки, представленной двумя нейробластическими слоями — источниками формирования всех типов клеток сетчатки. На этих стадиях развития сетчатки нуклеостемин выявляется главным образом в виде многочисленных дискретных скоплений в ядрышках и в нуклеоплазме прогениторных клеток. На 22-й нед пренатального развития область локализации нуклеостемина значительно сужается: белок преимущественно детектируется в клетках ганглиозного слоя сетчатки, а также в отдельных клетках внутреннего ядерного слоя, дифференцировка которых еще продолжается. К 31-й нед развития дифференцировка всех типов клеток сетчатки близка к завершению. При сохранении специфичности экспрессии на этой стадии развития наблюдается снижение числа нуклеостемин-позитивных клеток сетчатки. По мере дифференцировки клеток происходит не только смещение области локализации нуклеостемина во внутренние слои сетчатки, но также изменение его внутриядерной локализации. Нуклеостемин локализуется главным образом на ядерной мембране, хотя в единичных клетках детектируется и в ядрышках, и в нук-

леоплазме. Полученные результаты согласуются с данными о наличии в сетчатке прогениторных клеток по крайней мере до 31-й нед, самой поздней из исследованных нами стадий. Локализация нуклеостемина не только в малодифференцированных, но и в дифференцированных клетках может свидетельствовать о том, что его функции в сетчатке не ограничиваются участием в контроле пролиферации клеток. Пространственно-временная динамика экспрессии нуклеостемина в клетках разного типа дифференцировки развивающейся сетчатки может отражать его функциональную роль в сетчатке на разных этапах развития. Изучение молекулярных и клеточных механизмов регуляции экспрессии нуклеостемина в ходе пренатального развития сетчатки является предметом дальнейших исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00462) и программы президиума РАН «Биоразнообразию».

АНАЛИЗ ПРОСТРАНСТВЕННОГО ПОЛОЖЕНИЯ ХРОМОСОМ ТИПА ЛАМПОВЫХ ЩЕТОК В ЯДРАХ ООЦИТОВ ДОМАШНЕЙ КУРИЦЫ И ЯПОНСКОГО ПЕРЕПЕЛА. © А. В. Маслова,¹ А. В. Красикова¹ Лаборатория структуры и функции хромосом и кафедра цитологии и гистологии С.-Петербургского государственного университета, spbchromas@gmail.com.

Трехмерная организация генома в пространстве клеточного ядра отражает особенности его функционирования и представляет собой один из уровней регуляции его экспрессии. Закономерное радиальное распределение хромосом установлено для многих типов клеток организма. Как правило, в соматических клетках близость территории хромосомы к центру ядра коррелирует с количеством и функциональной активностью содержащихся в ней генов. Особый интерес в исследовании регулируемого изменения пространственной структуры хромосом представляет изучение специализированных клеток, таких как растущие ооциты. Мейотические биваленты в ооцитах многих видов животных приобретают характерную форму ламповых щеток (ЛЩ) и не контактируют с ядерной мембраной. В настоящей работе проанализировано радиальное распределение трех различающихся по размеру и генной плотности групп хромосом в форме ЛЩ в транскрипционноактивных ядрах ооцитов домашней курицы и японского перепела. Важную роль в исследованиях трехмерной организации генома играет выбор адекватного способа пространственных измерений. Мы применили три разных способа оценки положения макро-, миди- и микрохромосом птиц относительно центра ядра ооцита. Микрохирургически изолированные из ооцитов и сохранившие свою структурную целостность ядра окрашивали НК-специфичным флуоресцентным красителем и анализировали с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Поскольку на 3D-реконструкциях ядер ооцитов хорошо различимы все хромосомы кариотипа, оказалось возможным осуществить визуальный подсчет общего числа бивалентов в трех радиальных зонах ядра (центральной, периферической и промежуточной). Визуальный анализ показал неравномерное распределение хромосом типа ЛЩ в ядре ооцита с большинством бивалентов, локализующихся в промежуточной области ядра.

Дополнительные возможности для оценки положения и морфологии бивалента в ядре дает использование специальных программ, позволяющих построить объемные изоповерхности по контуру флуоресцентного сигнала от индивидуальных бивалентов. Мы измерили абсолютные расстояния от центра ядра до центров масс изоповерхностей бивалентов и подсчитали среднее число центров масс в разных областях ядра. Результаты подтвердили, что большинство макро-, миди- и микрохромосом на стадии ЛЩ располагается в промежуточной зоне ядра ооцита. Измерение абсолютного расстояния от центра ядра до отдельных сегментов хромосомы с применением программных средств проведения 3D-измерений позволяет получить дополнительные сведения о ее локализации. Анализ радиального распределения в пространстве ядра теломеров всех хромосом на стадии ЛЩ показал, что у бивалентов с более периферическим положением центров масс одна или обе пары терминальных хромомеров также расположены ближе к периферии ядра. Таким образом, наибольшую информативность дает сочетание нескольких методов анализа радиального распределения хромосом. Сопоставление полученных результатов позволило установить специфический характер 3D-организации кариотипа в ядрах ооцитов птиц, который не соответствует установленному принципу корреляции более центрального положения хромосомы в интерфазном ядре с обогащенностью ее кодирующими белок последовательностями.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-90821-моб_ст), Комитета по науке и высшей школе Санкт-Петербурга и гранта президента РФ (№ МК-1677.2009.4) и при технической поддержке ЦКП «ХРОМАС» С.-Петербургского государственного университета.

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ ЧАСТОТОЙ МИКРОЯДЕР И ЯДЕРНЫХ ПРОТРУЗИЙ В КЛЕТКАХ БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА И ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ РЕПАРАЦИИ ДНК НА ФОНЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ РАДОНА. © А. В. Мейер,¹ А. А. Лунина,¹ А. В. Ларионов,¹ В. И. Минина,^{1,2} В. Г. Дружинин.^{1,2} ¹ Кафедра генетики Кемеровского государственного университета и ²Институт экологии человека СО РАН, Кемерово.

Одним из направлений современной экологической генетики является «генетика радиочувствительности», изучающая вклад генетических особенностей человека в реакции организма на ионизирующие излучения. Активно исследуются кариологические показатели нестабильности генома — микроядра и протрузии. Происхождение микроядер (МЯ) связывают с появлением ацентрических фрагментов хромосом или целых хромосом, оставшихся в ана-телофазе митоза и не вошедших в дочерние ядра; не исключено образование МЯ из ядерных почек (Рахманин, Сычева, 2007). Ядерные протрузии (ЯП) возникают путем завершения митозов кариотипически aberrантных клеток либо путем почкования интерфазных ядер (Кузоватов и др., 2000); также образование ЯП связывают с удалением из клетки амплифицированной ДНК, элиминацией из ядра ДНК-репарационных комплексов (Sharma, Iqbal, 2005). В настоящее время активно исследуется вклад полиморфизма генов репарации ДНК в формирование гено-

токсических эффектов у человека. В связи с этим целью настоящей работы стало изучение модифицирующего влияния полиморфизмов генов APE1, hOGG1 и ADPRT на кариологические показатели клеток буккального эпителия.

Исследуемая выборка включала в себя 144 человека в возрасте 13.02 ± 0.19 года, постоянно проживающих в школе-интернате г. Таштагол Кемеровской обл. В воздухе жилых и учебных помещений данного интерната неоднократно регистрировалось присутствие сверхнормативных доз радона. Пилотные исследования частоты клеток с МЯ и ЯП, а также уровня хромосомных нарушений у детей, проживающих в этом интернате, демонстрировали выраженное кластогенное воздействие радиационного фактора (Дружинин и др., 2009; Мейер и др., 2009). Материалом для исследования послужили препараты буккального эпителия и образцы ДНК, выделенные из периферической крови методом фенол-хлороформной экстракции. Приготовление препаратов буккального эпителия и идентификацию кариологических показателей осуществляли в соответствии с рекомендациями Holland (2008) и Tolbert (1992). Молекулярно-генетическое типирование полиморфизмов генов APE1 Asp148Glu, hOGG1 Ser326Cys и ADPRT Val762Ala проводили методом «SNP-экспресс» с использованием наборов реактивов, разработанных НПФ «Литех» (Москва).

В результате анализа установлена взаимосвязь между полиморфизмом гена APE1 и частотой клеток с МЯ и ЯП. У доноров с генотипом APE1 Glu/Glu частота клеток с МЯ составила 0.73 ± 0.16 %, частота встречаемости ЯП (суммарно типов «пузырек», «разбитое яйцо» и «язык») — 3.19 ± 0.28 %, что достоверно больше, чем у доноров с генотипом APE1 Asp/Glu, у которых частота клеток с МЯ составила 0.31 ± 0.06 % ($U_{M-W} = 1087$, $P = 0.03$), а суммарная частота ЯП — 2.80 ± 0.09 % ($U_{M-W} = 1089$, $P = 0.03$). Полиморфизм генов hOGG1 и ADPRT не оказал влияния на изученные показатели. Проведенное исследование позволило установить, что мутации в гене, обеспечивающем репарацию AP-сайтов (APE1), значительно повышают риск формирования индуцированных радоном МЯ и ЯП в буккальных эпителиоцитах человека.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-00497-а «Исследование полиморфизма генов репарации ДНК как маркеров индивидуальной радиочувствительности генома человека к воздействию радона и продуктов его распада») и Государственного контракта Министерства науки № 02.512.11.2233.

3D-ОРГАНИЗАЦИЯ ИНТЕРФАЗНЫХ ЯДЕР ФИБРОБЛАСТОВ БУРОЗУБКИ ИБЕРИЙСКОЙ, ОБЛАДАЮЩЕЙ ТЕЛОМЕРАМИ НЕОБЫЧНОЙ СТРУКТУРЫ.
© Ю. М. Минина, Н. С. Жданова, Т. В. Карамышева, Н. Б. Рубцов, А. Лондоно. Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия, и Институт Кюри, Париж, Франция, minina_jul@mail.ru.

Известно, что теломерные, центромерные и ядрышкообразующие (ЯО) районы хромосом играют особую роль в архитектонике клеточного ядра. С помощью FISH с пробами к теломерной и 18S-рибосомной ДНК (рДНК), а также иммунодетекции белков ядрышка и центромер мы провели исследование пространственной организации ин-

терфазных ядер фибробластов иберийской бурозубки *S. granarius*. Ранее мы обнаружили, что теломеры в хромосомах *S. granarius* имеют уникальную или редко встречающуюся структуру и размеры, которые резко отличаются от таковых у близкородственного вида и других изученных видов млекопитающих. Теломеры *S. granarius* делятся на два типа по размеру и локализации. На коротких плечах всех 32 акроцентриков локализованы чрезвычайно длинные теломеры размером в среднем 213 т. п. н., тогда как на длинных плечах всех акроцентриков и 4 метацентриков локализованы короткие теломеры размером около 3.8 т. п. н. Длинные теломеры *S. granarius* наряду с теломерной содержат 18S-рДНК, которая перемежается с теломерной по крайней мере в части длинных теломер.

Иммунодетекция компонента ядрышка белка B23 и FISH с пробой к теломерной ДНК в интерфазных ядрах *S. granarius* выявила крупные лопастные ядрышки, с которыми часть теломерных кластеров находилась в контакте. В некоторых случаях блоки теломерной ДНК были полностью погружены в ядрышко. По-видимому, связь с ядрышком имеют в основном те теломерные районы, в состав которых входят активные рибосомные гены. Ранее с помощью окраски нитратом серебра нами было выявлено 32 потенциально активных ЯО на коротких плечах всех акроцентриков *S. granarius*. FISH с теломерной ДНК и иммунодетекция компонента ядрышка, специфического кофактора РНК-полимеразы I — UBF, показала, что около 60 % кластеров теломерной ДНК контактирует с UBF. Учитывая то, что UBF является маркером активной транскрипции рибосомных генов, можно заключить, что, по-видимому, не во всех акроцентриках *S. granarius* ЯО активны.

Анализ пространственной организации интерфазных ядер фибробластов *S. granarius* после проведения FISH с пробой к теломерной ДНК показал, что теломеры проявляют тенденцию к слиянию, формируя кластеры, варьирующие по размеру, в количестве от 4 до 26. Такое поведение теломер, обладающих большими размерами, характерно для клеток, использующих так называемое альтернативное удлинение теломер (ALT), основанное на рекомбинации ДНК. Основным маркером ALT-клеток является присутствие в них специальных внутриядерных телец — APBs (ALT-associated PML bodies), которые, как было недавно показано, колокализуются с белками защитного комплекса теломер. Для выявления APBs мы использовали инновационный метод, основанный на свойствах мутантного белка вируса герпеса ICP0 накапливаться внутри APBs, увеличивая их в размере. 3D-анализ интерфазных ядер *S. granarius* выявил APBs, с которыми был колокализован белок защитного комплекса теломер Rap1. Таким образом, анализ пространственной организации интерфазных ядер *S. granarius* выявил в них признаки, характерные для ALT-клеток.

ГИСТОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОПУХОЛЕЙ, РАЗВИВШИХСЯ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МЫШАМ MDX КУЛЬТИВИРУЕМЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ C57BL/6, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ БЕЛОК GFP. © В. М. Михайлов,¹ Е. В. Каминская,¹ Б. В. Попов,¹ С. Н. Кузоватов,¹ Н. С. Скрипкина,² Г. П. Косякова,³ А. М. Зайчик,⁴ Т. М. Гринчук,¹ Н. Н. Никольский.¹
¹Институт цитологии РАН, ²Городское патологоанатомическое бюро, ³Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения с.-х. животных РАСХН и

⁴Медицинская академия последипломного образования, Санкт-Петербург, vmikhailov@mail.cytspb.rssi.ru.

Представлены результаты морфологической и цитохимической идентификации типов тканевых дифференцировок клеток опухолей, которые развились в 100 % случаев после внутримышечной или внутрисосудистой трансплантации мышам mdx культивируемых мезенхимных стволовых клеток (МСК) трансгенных мышей C57BL/6, экспрессирующих белок GFP (МСК-GFP) 43—45-го пассажей. Культивируемые клетки МСК-GFP характеризовались анеуплоидией; количество и набор хромосом в клетках были непостоянными в связи с нарушениями их копийности, присутствием перестроенных хромосом и мини-хромосом. Опухоли не возникали после трансплантации клеток МСК-GFP 43—45-го пассажей нормальным мышам C57BL/6. Опухоли были классифицированы как мезенхимомы, фибросаркомы и саркома. Внутри опухолей были обнаружены скопления адипоцитов и хрящевых клеток, костные балки с очагами эритроидного, миелоидного и тромбоцитарного кроветворения, а также участки нейрональной ткани с клетками глии. Обнаруженные типы тканевых дифференцировок опухолевых клеток соответствовали описанному в литературе спектру дифференцировок МСК, которые развивались *in vitro* после специфических индуцирующих воздействий. Спектр дифференцировок клеток опухолей из МСК-GFP оказался шире, чем описанный в литературе спектр дифференцировок опухолевых клеток из спонтанно трансформировавшихся *in vitro* МСК после трансплантации иммунодефицитным мышам или из трансфицированных *in vitro* МСК взрослых мышей после внутримышечной трансплантации мышам mdx. Представленные в настоящей работе результаты в совокупности с литературными и ранее полученными нами цитогенетическими данными показывают, что трансфекция генетическими конструкциями стволовых клеток, в том числе и тотипотентных стволовых клеток, как это имеет место при трансгенезе, сопровождается нарушениями стабильности собственного генома клеток, даже если работа трансфицированного гена (ген GFP) не сказывается на общем функционировании клеток.

МЕЖЪЯДЕРНЫЕ КОНТАКТЫ, ОБРАЗУЕМЫЕ ВЫРОСТАМИ ЯДЕРНОЙ ОБОЛОЧКИ В МЕЙОЦИТАХ ТАБАКА *NICOTIANA TABACUM* L. © С. Р. Мурсалимов, Е. В. Дейнеко. Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, mursalimovsr@gmail.com.

Микроспорогенез высших растений — это сложный многоступенчатый процесс, в результате которого из диплоидных мейоцитов образуются гаплоидные микроспоры. В ходе этого процесса клеточная стенка мейоцитов подвергается значительной перестройке, одна из особенностей которой — образование крупных каналов, напрямую связывающих цитоплазму соседних клеток. Такие межклеточные контакты, отличные от плазмодесм, получили название цитомиктических каналов, поскольку они активно участвуют в процессе цитомиксиса. Цитомиксис — это явление перемещения ядер между клетками по цитомиктическому каналу, которое чаще всего наблюдается в микроспорогенезе высших растений. Впервые это явление было описано более века назад и затем обнаружено у многих видов растений, в том числе и в мейоцитах табака *Nicotiana tabacum* L.

В наиболее типичном случае, после перехода ядра по цитомиктическому каналу из одной клетки в другую, ядро разделяется на несколько частей, образуя микроядра. Однако нами были выявлены случаи, когда вырост ядерной оболочки одного ядра пересекал клеточную стенку через цитомиктический канал и контактировал с ядром другой клетки, образуя «ядерный мостик». «Ядерный мостик» — это ограниченный ядерной оболочкой замкнутый канал, связывающий ядра соседних клеток. Через «ядерный мостик» ядерная оболочка одного ядра непосредственно переходит в ядерную оболочку другого, при этом не наблюдается участков, где целостность оболочки была бы нарушена. Внутри таких «ядерных мостиков» наблюдается хроматин, который, по всей видимости, перемещается из одного ядра в другое. Хроматин можно наблюдать на входе в «ядерный мостик», внутри него и на выходе в другое ядро. Маловероятно, что хроматин может получить какие-либо повреждения при таком способе миграции. Предполагается, что «ядерные мостики» при цитомиксисе возникают в результате растворения ядерной оболочки в месте контакта двух ядер (мигрирующего ядра и ядра клетки-реципиента) при переходе ядра через цитомиктический канал.

Цитомиксис является интересным феноменом и в последние годы привлекает внимание многих исследователей, поскольку миграция ядерного материала между мейоцитами может иметь определенные последствия при образовании мужского гаметофита. Наблюдаемые нами взаимодействия между ядрами растительных клеток, проявляющиеся в формировании «ядерных мостиков», дают основания по-новому оценить роль цитомиксиса в жизни растения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-01046а).

СИГНАЛ ЯДРЫШКОВОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ В ГИСТОНЕ H2В. © Я. Р. Мусинова, Е. В. Шеваль, В. Ю. Поляков. НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

Открытие подвижности ядерных компонентов и их обмена между специфическими сайтами (структурами) и окружающей нуклеоплазмой стимулировало работы по поиску механизмов накопления белков и нуклеиновых кислот в составе ядерных доменов. Наиболее очевидный механизм накопления связан с функционированием белков. Удержание белка в течение времени осуществления им функциональной активности потенциально ведет к увеличению концентрации в областях, содержащих сайты связывания. Однако есть основания полагать, что этот механизм не единственный. В случае ядрышка накопление высокодинамичных белков может быть связано с присутствием специализированных мотивов — сигналов ядрышковой локализации (NoLS). Обращает внимание, что весьма схожие NoLS обнаруживаются в белках с самыми разными функциями. Это косвенно свидетельствует в пользу того, что способ удержания на основе NoLS не сопряжен с функционированием белка. Хотя последовательности аминокислот, образующих NoLS в различных белках, варьируют в широких пределах, этот тип сигнальных мотивов может быть выявлен при анализе первичной струк-

туры полипептида. Мы обнаружили, что NoLS выявляются не только в ядрышковых белках. В частности, NoLS обнаруживается в коровом гистоне H2B. В течение суток после трансфекции плазмидой, кодирующей гистон H2B-EGFP, выявляются клетки, в которых экспрессированный белок имеет ядрышковую локализацию. Взаимодействие с ядрышком динамично (время полуобмена ~7 с). Показано, что такую аномальную локализацию имеет избыток белка, который в силу большого времени полуобмена не успевает встроиться в хроматин. Важно подчеркнуть, что гистон H2B имеет не только аномальную локализацию, но и некоторые свойства, характерные для ядрышковых белков, таких как B23. В частности, показано, что ядрышковый гистон входит в состав ядерного матрикса. Вероятно, ассоциация белка с матриксом определяется не только его химическими свойствами, но и особенностями взаимодействия с белками и другими клеточными компонентами. Химерный белок EGFP с помещенным на С-конце участком гистона, потенциально обладающим свойствами NoLS, накапливается в ядрышке. Таким образом, гистон H2B содержит NoLS, который не реализует свои свойства в обычных условиях. В чем причина существования в гистоне столь ненужного в функциональном плане мотива? Мы предположили, что NoLS входит в состав какой-то последовательности, необходимой для функционирования белка. В гистоне H2B были обнаружены два сигнала ядерной локализации, которые перекрываются с выявленным NoLS. Показано, что химерный белок EGFP с помещенными на С-конец сигналами ядерной локализации накапливается в ядрышке, что подтверждает данное предположение. Таким образом, роль NoLS может выполнять сигнал ядерной локализации. Данные работы подтверждают предположение о природе NoLS как неспецифического механизма удержания белков в ядрышке.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00884), ФЦП (2010-1.1-203-060 и НК-602П) и гранта президента РФ для молодых ученых (МК-1332.2010.4).

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ КООПЕРАТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ ТРОМБОЦИТАРНОГО ФАКТОРА РОСТА И ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА В КЛЕТКАХ РАКОВОЙ ОПУХОЛИ ЛИНИИ LNCaP ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА. © Н. Ю. Назарова, Г. И. Чихиржина. Кафедра биохимии С.-Петербургского государственного университета.

Пептидные факторы роста, действующие через тирозинкиназные рецепторы, играют существенную роль в этиологии рака предстательной железы. Эпидермальный фактор роста (EGF) обладает мощным митогенным действием на клетки предстательной железы. Показано, что в клетках фибробластов EGF может действовать кооперативно с тромбоцитарным фактором роста (PDGF). Механизмом взаимодействия между EGF и PDGF в клетках фибробластов, по-видимому, является PDGF-зависимая трансактивация рецепторов EGF (ErbB1). Характер экспрессии генов рецепторов PDGF в предстательной железе, а также роль PDGF в регуляции роста клеток предстательной железы практически не исследованы.

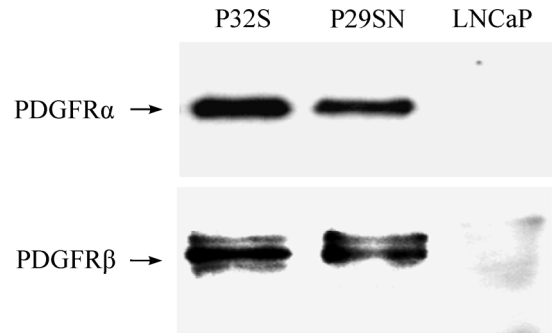


Рис. 1. Иммуноблот белков клеток эпителия (LNCaP) и стромы (P32S и P29SN) предстательной железы человека. Гибридизация с антителами к PDGFR α (верхняя панель) и PDGFR β (нижняя панель).

Мы показали, что клетки предстательной железы линий LNCaP и PC-3, имеющие эпителиальное происхождение, характеризуются очень низким уровнем экспрессии генов рецепторов тромбоцитарного фактора роста (PDGFR α и PDGFR β) по сравнению с клетками первичной культуры стромы предстательной железы P29SN и P32S. Анализ экспрессии генов проводился методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени и иммуноблотинга (рис. 1).

Полученные нами результаты продемонстрировали прямую корреляцию между уровнем экспрессии генов PDGFR α и PDGFR β и восприимчивостью клеток исследованных линий к митогенному действию тромбоцитарного фактора роста изоформы BB (PDGF-BB) и подтвердили, что клетки линии LNCaP невосприимчивы к митогенному действию PDGF-BB вследствие низкого уровня экспрессии его рецепторов, PDGFR α и PDGFR β . Уровень экспрессии гена исследованной изоформы тромбоцитарного фактора роста (PDGF-B), напротив, значительно выше в эпителиальных клетках линий PC-3 и LNCaP, чем в клетках первичной культуры стромы.

Мы впервые показали, что EGF индуцирует экспрессию гена PDGFR β . Метод ПЦР в режиме реального времени выявил увеличение содержания мРНК PDGFR β в 3—5 раз при инкубации клеток LNCaP в присутствии рекомбинантного EGF человека (рис. 2). Методом иммуноблотинга в клетках LNCaP, инкубированных с рекомбинантным EGF, также было выявлено небольшое количество белка PDGFR β .

Активный аналог витамина Д3 кальцитриол, обладающий антипролиферативным действием по отношению к клеткам предстательной железы, подавлял экспрессию

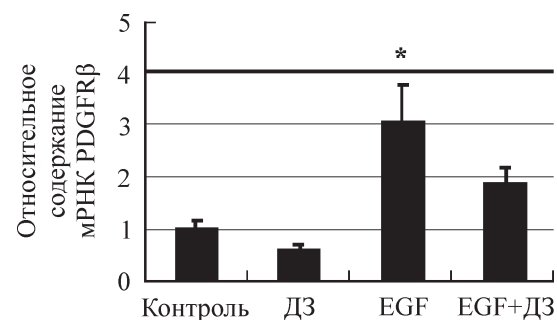


Рис. 2. Содержание мРНК PDGFR β в клетках LNCaP, обработанных EGF и кальцитриолом, по результатам ПЦР в реальном времени.

гена PDGFR β , индуцированную EGF. Полученные результаты согласуются с данными о том, что EGF увеличивает восприимчивость клеток LNCaP к митогенному действию PDGF-BB.

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ МОЛОДЫХ СУБСЕМЕЙСТВ ALU γ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ АПОПТОЗЕ. © Т. В. Никитина, Л. Гао, К. Е. Карпачева, И. Н. Кабанов, Л. И. Тищенко. Кафедра биохимии С.-Петербургского государственного университета.

В настоящее время есть основания полагать, что Alu-последовательности (представители мобильных элементов класса SINE у человека) и их транскрипты, синтезируемые РНК-полимеразой III, могут играть существенную роль в активации пролиферации, опухолевой трансформации, стрессе и апоптозе. Однако роль Alu-последовательностей и их РНК-продуктов в регуляции внутриклеточных процессов до сих пор не выяснена.

Целью работы являлось исследование взаимосвязи между уровнем экспрессии молодых субсемейств Alu-повторов AluYa5 и AluYb8 и уровнем их метилирования, а также физиологическим статусом клетки (стадии покоя, пролиферации и апоптоза). Методом количественной ОТ-ПЦР в реальном времени получены данные об экспрессии AluYa5 и AluYb8 в клетках гистиоцитарной лимфомы U937 и AluYb8 в клетках хронической миелогенной лейкемии K562, находящихся в состоянии покоя, пролиферации и апоптоза, вызванного ингибитором топоизомеразы I камптотецином (в клетках U937 Alu-последовательности конститутивно гиперметилированы, а в клетках K562 гипометилированы). Уровень экспрессии генов Alu (AluYa5 и AluYb8) оценивали по содержанию соответствующих РНК в тотальной РНК клеток. Выявлено повышение содержания AluYa5- и AluYb8-РНК в 2—3 раза в апоптотических клетках U937 по сравнению с пролиферирующими и в 4—8 раз по сравнению с покоящимися. Показано также повышение содержания AluYb8 более чем в 3 раза в апоптотических клетках K562 по сравнению с пролиферирующими.

Одним из возможных механизмов увеличения уровня экспрессии молодых субсемейств Alu при апоптозе является изменение уровня их метилирования. Для проверки данного предположения исследовали метилирование AluYb8 методом MethyLight в пролиферирующих и апоптотических клетках U937 и K562. Показано, что доля последовательностей AluYb8, метилированных в областях, комплементарных праймерам, составляла $92 \pm 6\%$, а неметилированных — $7 \pm 5\%$ в клетках U937 и $77 \pm 6\%$ и $23 \pm 6\%$ соответственно в клетках K562. Эти показатели не зависели от физиологического состояния клеток. Таким образом, повышение уровня экспрессии AluYb8 при апоптозе не сопровождалось изменением (снижением) уровня их метилирования. Следует отметить, что метод MethyLight позволяет исследовать метилирование лишь тех CpG-сайтов, которые расположены в участках, комплементарных используемым для ПЦР праймерам. В данной работе были исследованы участки AluYb8, не включающие в себя промотор. Не исключено, что влияние на транскрипцию будет оказывать степень метилирования именно CpG-сайтов, входящих в состав промотора, так как именно с промотором связываются базальные транскрипционные факторы TFIIIB и TFIIIC, которые привле-

кают в транскрипционный комплекс РНК-полимеразу III. С другой стороны, недавно полученные данные свидетельствуют о том, что на транскрипцию генов класса III (к которым принадлежат Alu-повторы) существенное влияние оказывает метилирование CpG-сайтов, расположенных не внутри гена, а в 5'-фланкирующей области. Таким образом, можно предположить, что в случае Alu-повторов высокий уровень экспрессии AluYb8 при апоптозе связан с увеличением уровня экспрессии тех, по-видимому немногочисленных, копий AluYb8, которые гипометилированы в области промотора и(или) 5'-фланкирующей области.

Дальнейшие исследования метилирования CpG-сайтов в области промотора и в его 5'-фланкирующей области позволят оценить взаимосвязь уровней метилирования AluY, уровня их экспрессии и физиологического статуса клетки.

ХРОМОСОМОСПЕЦИФИЧНЫЕ ПОВТОРЫ МЫШИ. © О. И. Подгорная, Е. В. Гаврилова, А. С. Комиссаров. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Разделение на хромосомы — универсальный способ существования генома эукариот. Центромерный (ЦЕН) и периЦЕН районы уникальны у разных видов по входящим в их состав сателлитным ДНК (сатДНК) или тандемным повторам (ТП). У человека существуют не только хромосомоспецифичные варианты ЦЕН альфа-сатДНК, но блоки больших сатДНК метят отдельные хромосомы. СатДНК мыши не охарактеризованы, кроме мажорной сатДНК (периЦЕН) и минорной сатДНК (ЦЕН). Они есть на всех хромосомах, хотя и в разных количествах, и хромосомоспецифичные варианты для них неизвестны. Программа TRF (Tandem Repeat Finder) определяет около 15 % базы как ТП в базе данных WGS (Whole Shotgun Sequences). Выбрали только ТП, расположенные полями не менее 3 т. п. н. Среди нескольких классов ТП выделили один, который отличают небольшая длина мономера (20—100 н. п.), небольшая вариабельность в поле мономеров (< 35 %) и предсказанное *in silico* расположение на определенных хромосомах, т. е. возможна хромосомоспецифичность этого класса повторов. Для экспериментальной проверки полученных *in silico* предсказаний выбрали 10 консенсусных мотивов и изготовили на их основе пробы для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Синтетические олигонуклеотиды длиной 100—130 н. п. состоят из тандемно повторенных мономеров; на концах — разные адаптеры (1 и 2), одинаковые для всей серии. Вариации от консенсуса мономера, замеченные в естественных последовательностях на конкретных хромосомах, сохранены; мечение ПЦР происходило на обращенных по сравнению с адаптерами праймерах. Повтор N21 составляет 5 % всех выбранных ТП и *in silico* расположен на 5 хромосомах в периЦЕН. Двойной FISH с коммерчески доступными хромосомоспецифичными ВАС-пробами доказано, что ТП N21 присутствует на хромосомах 3 и 17 в соответствии с предсказанием *in silico*. Повтор N54 не картируется *in silico* на собранном геноме и найден в «несобранной» хромосоме (Chromosome Unknown). *In situ* N54 находится в прителомерном районе 1/3 хромосомного набора. Во всех остальных случаях, как правило, количество хромосом, несущих сигнал *in situ*, больше, чем предсказанное *in silico*. Определены точные номера хромосом, несущих сигнал каждой пробы. ЦЕН и значи-

тельная часть перичЕН района отсутствуют в геноме мыши. На них отведено по 3 млн н. п. на каждой хромосоме. Естественно, что в этих областях могут располагаться и найденные ТП. Однако существование ТП, метящих группы хромосом мыши, не вызывает сомнений, а возможно, их сочетание определяет индивидуальность хромосомы.

ИНГИБИТОРЫ HDAC ИНДУЦИРУЮТ АПОПТОЗ В E1A+RAS-ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТАХ, НЕ ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ БЕЛОК GADD45 α .
© А. К. Пожидаева, М. В. Абрамова, С. Б. Светликова, В. А. Поспелов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, leff0308@mail.ru.

Ингибиторы гистоновых деацетилаз (HDAC) способны подавлять пролиферацию опухолевых клеток, индуцируя апоптоз и(или) остановку клеточного деления. Благодаря этому в настоящее время большое внимание уделяется ингибиторам HDAC как новому многообещающему классу противоопухолевых препаратов. Выбор антипролиферативного эффекта — апоптоз или остановка клеточного цикла — зависит от типа трансформации и клеточного контекста. Однако точные механизмы антипролиферативного действия ингибиторов HDAC остаются невыясненными.

Мы исследовали роль белка Gadd45 α в антипролиферативном эффекте ингибиторов HDAC бутирата натрия (NaB) и трихостатина А (TSA) в эмбриональных фибробластах мыши, трансформированных онкогенами E1A и cHa-ras. Gadd45 α известен как белок, индуцируемый различными ДНК-повреждающими факторами и стрессами, которые сопровождаются блоком пролиферации. Ранее была установлена роль Gadd45 α в таких клеточных процессах, как пролиферация, репарация ДНК, контроль клеточного цикла и апоптоз.

Отсутствие в клетках белка Gadd45 α (клетки Gadd $^{-/-}$) не приводит к исчезновению индуцированного ингибиторами HDAC блока клеточного цикла, характерного для исходных трансформантов (клетки MERas). Однако в отличие от клеток MERas где продолжительная обработка ингибиторами HDAC индуцирует преждевременное клеточное старение, клетки Gadd $^{-/-}$ подвергаются апоптотической гибели при действии NaB и TSA.

Исследовали активность антиапоптотического транскрипционного фактора NF- κ B в экспериментах по трансфекции репортерного вектора 3* κ B-luc, кодирующего люциферазу под контролем NF- κ B-регулируемого промотора. Оказалось, что в отличие от трансформантов ME-Ras, где ингибиторы HDAC активируют NF- κ B в десятки раз, в клетках Gadd45 $^{-/-}$ наблюдается небольшое повышение активности NF- κ B-регулируемого промотора (в 2 раза) на короткое время (24 ч). При дальнейшем действии ингибиторами HDAC (48—72 ч) активность падает до уровня, ниже базального. Методом иммуноблоттинга мы показали, что в клетках Gadd45 $^{-/-}$ при действии NaB накапливаются расщепленные формы каспазы 3, что говорит об активации этой протеазы в клетках. Далее эти данные были подтверждены в экспериментах по расщеплению каспазой 3 синтетического колориметрического субстрата. Было показано, что активность каспазы 3 при действии NaB в не экспрессирующих Gadd45 α клетках возрастает в 10 раз, тогда как в контрольных трансформантах NaB вызывал снижение ак-

тивности каспазы 3 в отношении синтетического субстрата.

Известно, что MAP-киназы p38 и JNK, принимающие участие в программах старения и апоптоза, являются мишенями Gadd45 α . В связи с этим методом иммуноблоттинга исследовали динамику содержания этих белков в клетках MERas и Gadd45 $^{-/-}$ при воздействии ингибитором HDAC. Мы не показали увеличения количества фосфорилированных форм p38 и JNK после обработки NaB в не экспрессирующих Gadd45 α фибробластах, в то время как в исходных E1A+Ras-трансформантах происходило существенное накопление данных стресс-киназ после 72 ч воздействия. Следовательно, по-видимому, отсутствие в клетках Gadd45 α блокирует запуск данных киназных каскадов.

Таким образом, мы показали, что апоптоз в фибробластах Gadd45 $^{-/-}$, вызываемый действием ингибиторов HDAC, опосредуется активацией в клетках каспаз и ингибированием активности антиапоптотического фактора NF κ B, а также модулированием активности сигнальных каскадов с участием p38 и JNK.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00466) и программы президиума РАН «Молекулярная клеточная биология».

ИЗУЧЕНИЕ РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК В УРОТЕЛИИ В ОПЫТАХ IN VIVO.
© Б. В. Попов,¹ М. Б. Будько,² Н. А. Пица,³ Е. Н. Толкунова,¹ О. В. Жидкова,¹ С. А. Кошкин,¹ Н. С. Петров,¹ А. М. Зайчик,² Б. К. Комяков.⁴ ¹Институт Цитологии РАН, ²С.-Петербургская государственная медицинская академия последипломного образования Росздрава, ³Кафедра патологической физиологии медицинского факультета С.-Петербургского государственного университета и ⁴Кафедра урологии С.-Петербургской государственной медицинской академии им. И. И. Мечникова, popov_478@hotmail.com.

Хирургическая аутопластика органов мочевыделительной системы по неотложным показаниям производится в медицинских клиниках с середины прошлого века, однако механизмы восстановления уротелия, играющего основную функциональную роль в выведении мочи, до настоящего времени остаются неизученными. Современные представления о роли соматических стволовых клеток (ССК) в поддержании клеточного состава самообновляющихся органов позволяют предположить, что биологической основой восстановления является генетическое репрограммирование в зрелые клетки уротелия ССК той ткани, которая была использована для его хирургической аутопластики. Исследование механизмов пластичности ССК, обеспечивающей их трансдифференцировку в функционально зрелые клетки иной тканевой специфичности, например мезенхимные стволовые клетки (МСК) или стволовые клетки кишечника, в клетки уротелия, в настоящее время находится на этапе экспериментального анализа. Такой анализ включает в себя изучение регуляции основных функций МСК, стволовых клеток кишечника и уротелия. В регуляции пролиферации и дифференцировки клеток уротелия важная роль принадлежит сигнальным путям EGF и Wnt/ β -катенину, активность которых может быть оценена по уровню продукции соот-

ветственно белков Her-4 и Tcf3/4. Мы установили, что МСК, меченные трансгенным Gfr, не экспрессируют в культуре *in vitro* Her-4 и Tcf3/4, но активируют их продукцию после трансплантации в мочевого пузыря, подвергнутой криотравме. После переноса МСК или клеток кишечника в ткань мочевого пузыря Gfr определяется в ней с помощью метода обратной транскрипции—полимеразной цепной реакции, а колокализация в некоторых клетках уротелия Her-4 или Tcf3/4 с Gfr выявляется при иммуногистохимической окраске ткани специфическими антителами, связанными с флуоресцентной меткой. Полученные результаты свидетельствуют о том, что сингенные соматические клетки, трансплантированные в мочевого пузыря, могут подвергаться трансдифференцировке в клетки уротелия, что свидетельствует об их генетическом репрограммировании. Механизмы подобного репрограммирования могут быть изучены *in vitro* путем экспрессии в соматических клетках генов, обеспечивающих их трансдифференцировку в уротелий.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00595).

ИНГИБИТОРЫ HDAC ВЫЗЫВАЮТ АКТИВАЦИЮ DDR-СИГНАЛЬНОГО ПУТИ И ИНДУЦИРУЮТ КЛЕТОЧНОЕ СТАРЕНИЕ. © В. А. Поспелов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

В опухолевых клетках выявлены эпигенетические изменения экспрессии генов, в частности репрессия ряда опухоле-супрессорных генов, путем метилирования промоторов и деацетилирования нуклеосомных гистонов. Ингибиторы гистон-деацетилаз (HDACi) вызывают ремоделирование структуры хроматина благодаря ацетилированию гистонов и негистоновых белков, тем самым способны вызывать дерепрессию опухоле-супрессорных генов, репрессию пролиферативных генов (циклинов А, Д и Е) и активацию ингибитора циклинзависимых киназ p21-Waf1. В зависимости от клеточного контекста HDACi могут индуцировать блок клеточного цикла, старение, апоптоз или дифференцировку. В настоящей работе будет показано, что действие HDACi бутирата натрия (NaB) на опухолевые клетки грызунов индуцирует в них процесс старения, который связан с появлением необратимого блока G₁/S, вызванного изменением транскрипции циклинов и ингибиторов циклинзависимых киназ, декомпактизацией хроматина с одновременным появлением фокусов гетерохроматизации, ассоциированных со старением (SAHF). Старение сопровождается накоплением фокусов гистона Ser139-H2AX (γH2AX), являющегося маркером разрывов ДНК. Однако в отличие от облучения накопленные фокусы γH2AX при действии HDACi не связаны с появлением однонитевых разрывов ДНК, как было показано методом ДНК-комет. Фокусы γH2AX при старении не содержат pATM-киназы, которая, как считают, фосфорилирует гистон H2AX по Ser139, а также 53BP1 — белка, который является маркером разрывов DSB при повреждении ДНК. Формирование фокусов γH2AX не подавляется ингибитором ATM, однако их количество падает примерно на 50 % при действии рапамицина — ингибитора mTOR-киназы. Интересно, что рапамицин способен отменять HDACi-индуцированное старение в клетках mERas. Цитоплазматические события при старении связаны с ак-

тивацией mTOR-киназы, что следует из данных по накоплению pS6-белка рибосом и фактора 4E-BP, необходимых для активации трансляции. В NaB-обработанных трансформантах, остановленных HDACi в клеточном цикле на стадии G₁/S, происходит клеточная гипертрофия. Одновременно наблюдаются процесс перестройки актинового цитоскелета, накопление винкулин-позитивных фокальных контактов и подавление способности клеток мигрировать в рану и через поры мембран. Таким образом, HDACi можно рассматривать как цитостатики нового поколения, которые, имитируя через эпигенотипические механизмы DDR-ответ, способны вызывать в опухолевых клетках плеiotропные изменения, характерные для стареющих клеток, приводящие к необратимому подавлению пролиферации.

ЭКТОПИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ В РАЙОНАХ ИНТЕРКАЛЯРНОГО ГЕТЕРОХРОМАТИНА У DROSOPHILA MELANOGASTER ВОССТАНАВЛИВАЕТ ИХ ЭУХРОМАТИНОВЫЕ СВОЙСТВА. © Г. В. Похолкова, Е. С. Беляева, В. Ф. Семешин. Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, galina@mbc.nsc.ru.

В политенных хромосомах *Drosophila melanogaster* различают два типа гетерохроматиновых районов — прицентромерный (ПГХ) и интеркалярный (ИГХ). ИГХ-районы располагаются в плечах хромосом и имеют много общих свойств с ПГХ: плотная упаковка хроматина, генетическая репрессия, задержка завершения репликации, связывание как с белками-сайленсерами, так и с белком SUUR-продуктом гена, мутации которого супрессируют недорепликацию. Для ПГХ-районов давно известен феномен эффекта положения мозаичного типа (ЭПМ), когда эухроматиновые гены, приближенные к этим районам, инактивируются в части клеток, что приводит к появлению мозаичного фенотипа. Ранее из мировых коллекций были получены линии со встройками, содержащими UAS-последовательности и гены-маркеры *u⁺* и *w⁺*, в ИГХ-районы разных хромосом. Глаза и щетинки у мух были мозаично окрашенными. Остается вопрос о природе влияния ИГХ-районов на этот феномен.

Целью данной работы было исследование возможности ИГХ-районов инактивировать перенесенные к ним эухроматиновые гены и анализ воздействия эктопической транскрипции в этих районах на гетерохроматиновые характеристики ИГХ-районов.

Было выбрано 9 линий с максимальным проявлением мутантных фенотипов *u* и *w*. Используя систему инсерционного *P*-мутагенеза, в 8 линиях мы получили особей с полным восстановлением окраски фасеток и щетинок у мух. Было показано, что инсерты переместились из ИГХ-районов в другое хромосомное окружение. Полное восстановление активности гена *w⁺* в этих же линиях было получено в системе UAS > GAL4, вызывающей эктопическую транскрипцию в ИГХ-районах при использовании повсеместно действующего драйвера *act-Gal4*. Таким образом, ИГХ-районы могут инактивировать эухроматиновые гены.

Хроматиновые изменения, вызванные эктопической экспрессией в ИГХ-районах, были проанализированы на политенных хромосомах на примере района 11A6-9 X-хромосомы. В нормальных условиях он поздно заканчивает репликацию, недореплицирован у самок и содер-

жит белок SUUR. В работе использовали 2 трансгенные линии, содержащие *UAS*-встройки в районах, которые сильно (линия 14833) или слабо (линия 15544) недореплицируются. В качестве драйверов были использованы *da-GAL4* с повсеместной активностью и *AB-1-GAL4* с активностью в слонных железах. В линии со встройкой 14833 на политенных хромосомах наблюдали пуфф в районе 11A. Согласно данным электронной микроскопии, он формировался из материала дисков 11A6-9. Белок SUUR отсутствовал в пуффе и выявлялся только на правой границе диска 11A9. Согласно данным иммуноокрашивания на антитела против PSNA, которые позволяют проследить паттерн репликации политенных хромосом, пуфф 11A6-9 заканчивает репликацию без задержки. Используя антитела на белки, характерные для активного и репрессированного хроматина, был проанализирован хроматиновый статус пуффирующего района.

В целом эктопическая транскрипция приводила к появлению активного хроматина на протяженном участке ДНК, ранее демонстрирующего гетерохроматиновые свойства.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы президиума РАН МКБ № 22.4 и государственного контракта «Роснаука» № 02.740.11.0099.

ОРГАНИЗАЦИЯ, МОЛЕКУЛЯРНЫЙ СОСТАВ И ВОЗМОЖНЫЕ ФУНКЦИИ УНИВЕРСАЛЬНЫХ ЯДЕРНЫХ ДОМЕНОВ — КЛАСТЕРОВ ИНТЕРХРОМАТИНОВЫХ ГРАНУЛ ООЦИТОВ МЫШИ — НА ЗАВЕРШАЮЩИХ ЭТАПАХ ООГЕНЕЗА. © Г. Н. Почукалина, Д. С. Боголюбов, В. Н. Парфенов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, galina@mail.cytspb.rssi.ru.

Ядра ооцитов мыши на стадии поздней диплотены содержат многочисленные крупные кластеры интерхроматиновых гранул (КИГ) — универсальные и эволюционно консервативные экстрахромосомные компартменты ядра. КИГ обогащены факторами сплайсинга пре-мРНК — малыми ядерными РНП и SR-белками. В конце оогенеза мыши, в преовуляторных ооцитах, КИГ приобретают характерную структурную организацию: они состоят из 10—15-нанометровых гранул, составляющих основу кластера, и периферических фибриллярных зон, в контакте с которыми располагаются участки деконденсированного хроматина. Кроме изучения особенностей структуры КИГ задачей работы явилось молекулярное картирование в связи с КИГ преовуляторных ооцитов мыши поли(А)⁺-РНК, белков семейства А/В гетерогенных ядерных (гя) РНП и ведущего фактора экспорта мРНК NXF1/TAP. Поли(А)⁺-РНК выявляли с помощью микроинъекций в ооциты 2'-*O*-метилолигорибонуклеотидных зондов (2'-*O*-Me(U)₂₂), конъюгированных с флуорохромом тетраметилпроламином. В качестве молекулярного маркера КИГ был выбран SR-белок SC35, являющийся одним из ведущих факторов сплайсинга пре-мРНК и в высокой концентрации присутствующий в КИГ различных клеток. Этот фактор, а также белки А/В гяРНП и NXF1/TAP выявляли специфическими антителами с использованием лазерной сканирующей конфокальной и иммуноэлектронной микроскопии. С помощью ингибитора белковых фосфатаз оокадаевой кислоты нам впервые удалось продемонстрировать динамику КИГ в условиях специфического фосфорилирования SR-белков и под-

твердить зависимость целостности КИГ от уровня фосфорилирования этих белков. Экспозиция ооцитов в среде с оокадаевой кислотой в течение 2 ч приводила к распаду КИГ во всех исследованных ядрах. Получены также однозначные данные по накоплению в КИГ поли(А)⁺-РНК, где она локализуется совместно с белком SC35. В серии других экспериментов в КИГ преовуляторных ооцитов мыши обнаружены также факторы экспорта мРНК: белки из семейства А/В гяРНП и белок NXF1/TAP, которые локализовались с белком SC35 и друг с другом. Данные иммунофлуоресцентной (конфокальной) микроскопии подтверждены на ультраструктурном уровне (с помощью иммуномечения ультратонких срезов). Полученные сведения о совместной локализации в КИГ ооцитов мыши полиаденилированных РНК и факторов ее экспорта подтверждают современные представления о функциональной значимости КИГ не только как резервуаров факторов сплайсинга, но и ядерных компартментов, участвующих в процессах метаболизма мРНК, в частности в ее экспорте.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00723) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ НУКЛЕОСОМНОЙ СТРУКТУРЫ ХРОМАТИНА ПРИ ДЕПРЕССИИ ГЕНОВ. © Т. Н. Прияткина, Е. Ю. Павлова, Е. В. Дефорж. Кафедра биохимии С.-Петербургского государственного университета.

В исследовании характера преобразования (ремоделирования) нуклеосом для реализации матричных функций ДНК перспективным подходом остается анализ нуклеазной фрагментации хроматина в составе ядер, позволяющий установить изменения ДНК-гистоновых взаимодействий. Первым биохимическим показателем преобразования нуклеосомной структуры хроматина при дерепрессии генов явились данные о появлении доступности всей внутринуклеосомной ДНК для переваривания ДНКазой I. Однако ДНК кодирующих областей активных и компетентных к транскрипции генов, полностью расщепляемая ДНКазой I до кислоторастворимых продуктов, резистентна к действию микрококковой нуклеазы (МНазы). По вопросу о том, соответствует ли распределение сайтов МНазных разрывов нуклеосомному типу организации хроматина, данные противоречивы.

Мы исследовали характер фрагментации ДНК кодирующих областей генов *trp*-диоксигеназы (*to*) и *tug*-аминотрансферазы (*tat*) в активном (в ядрах клеток печени крыс) и репрессированном (в ядрах мозга) состояниях тремя нуклеазами — МНазой, ДНКазой I и ДНКазой II. Чтобы по возможности исключить влияние внутриядерных нуклеаз и протеаз на изучаемый характер фрагментации ДНК, все операции по очистке ядер проводили в интервале температур -2—0 °С. Выделенные ядра инкубировали с ферментами при градиенте температуры от 0 до 20 °С в течение 10—15 мин. Интенсивность переваривания ДНК регулировали только вариациями концентрации ферментов.

Установлено, что при этих условиях ни одна из нуклеаз практически не продуцирует в ядрах клеток печени фрагментов генов *to* и *tat* с длиной мономеров или олигомеров нуклеосомного повтора, образующихся при нукле-

азной фрагментации хроматина с канонической нуклеосомной структурой. В лимите переваривания МНазой, который достигается при кратком действии фермента в насыщающей концентрации, общий (репрессированный) хроматин фрагментируется преимущественно до моно- и динуклеосом. При этом *to*- и *tat*-ДНК в гидролизатах ядер печени оказывается представленной полноразмерными единицами транскрипции (19 000 и 11 000 п. н. соответственно) и их крупными (от 1500 п. н.) фрагментами с монотонным распределением длины. В сходных условиях под действием ДНКазы I вся *to*- и *tat*-ДНК переваривается до кислоторастворимых продуктов. ДНКазы II по характеру фрагментации хроматина генов *to* и *tat* в их активном состоянии оказалась сходной с МНазой.

Три нуклеазы различаются по способу нуклеолитического действия: ДНКазы I вводит одноцепочечные разрывы и расщепляет свободную ДНК в сайтах их совпадений; МНаза осуществляет симметричный двухнитевой разрыв двойной спирали; ДНКазы II продуцирует одно- и двухнитевые разрывы с равной вероятностью. Все три нуклеазы фрагментируют репрессированный хроматин по межнуклеосомным линкерам. Возрастание вероятности двухнитевых разрывов внутринуклеосомной ДНК ДНКазой I в хроматине дерепрессированных генов (распада до кислоторастворимых продуктов) свидетельствует об освобождении фосфодиэфирных связей, экранированных гистонами в компактных частицах. Однако ДНК остается недоступной для МНазного действия — разрыва двух связей, противоположащих на двойной спирали. При этом зона резистентности перекрывает свободную ДНК межнуклеосомных линкеров, распространяется на протяженные участки единиц транскрипции. Обсуждается модель обратимого перехода хроматина в активную конформацию, учитывающая наблюдаемые изменения в доступности ДНК к трем нуклеазам.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЛОКАЛИЗОВАННЫХ НА ЯДЕРНОМ МАТРИКСЕ КОМПЛЕКСОВ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ГЕНОМА. © С. В. Разин, А. А. Гаврилов, О. В. Яровая. Институт биологии гена РАН, Москва.

Мы разработали модификацию метода фиксации конформации хромосомы (Chromosome Conformation Capture, 3C), позволяющую анализировать взаимное расположение прикрепленных к ядерному матриксу фрагментов ДНК. Принципиальным отличием нового протокола (Matrix 3C, МЗС) от стандартной процедуры 3C является исключение этапа фиксации ядер формальдегидом. Из клеток выделяют так называемые нуклеоиды, которые состоят из ядерного матрикса и прикрепленных к нему петель геномной ДНК. Дистальные части петель ДНК отщепляются рестриктазами, после чего анализируется вероятность лигирования прикрепленных к ядерному матриксу фрагментов ДНК. С использованием нового экспериментального протокола мы изучили роль ядерного матрикса в поддержании пространственной организации фрагмента хромосомы 14 кур, включающего в себя кластер глобиновых генов и окружающие его гены «домашнего хозяйства». Было продемонстрировано, что ассоциированные с генами домашнего хозяйства СрG-островки образуют комплекс (транскрипционную фабрику), который закреплен на ядерном матриксе. В эритроидных клетках к этому комплексу привлекаются регуляторные элементы глобиновых генов. Однако взаимодействия между этими регу-

ляторными элементами и СрG-островками, включающими в себя промоторы генов «домашнего хозяйства», не стабилизированы ядерным матриксом. Они разрушаются при обработке ядер концентрированным солевым раствором. Полученные результаты позволяют предположить, что транскрипционные фабрики, одновременно осуществляющие транскрипцию генов «домашнего хозяйства» и тканеспецифичных генов, состоят из двух компартментов. «Перманентный компартмент» закреплен на ядерном матриксе и осуществляет транскрипцию генов «домашнего хозяйства».

МОДИФИКАЦИЯ ХОЛОФЕРМЕНТА ДНК-ЗАВИСИМОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ III МЛЕКОПИТАЮЩИХ. © В. М. Седова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

ДНК-зависимая РНК-полимераза III транскрибирует спектр ядерных стабильных РНК, которые не транслируются, но участвуют в очень важных для жизнедеятельности клетки процессах: процессинг и сплайсинг матричных РНК, трансляция белков и ряд регуляторных процессов, включая РНК-интерференцию. По современным представлениям, регуляция экспрессии генов, осуществляемая РНК-полимеразой III, столь же сложна, как и РНК-полимеразой II. Известно, что фосфорилирование и гликозилирование СОО-терминального домена самой крупной из субъединиц РНК-полимеразы II играют ключевую роль в регуляции различных этапов транскрипции генов класса II и позволяют очень сильно повысить уровень контроля функциональной активности фермента. Фосфорилирование и О-гликозилирование остатками N-ацетилглюкозамина, по современным представлениям, являются той посттрансляционной модификацией, которая очень широко распространена в цитоплазматических и ядерных белках (Torres, Hart, 1984) и скорость обмена которой существенно превышает скорость обмена белков-носителей этой модификации (Wells et al., 2002, 2003). Роль фосфорилирования в регуляции транскрипции РНК-полимеразы III впервые показали Хокман и Шульц (1986).

Целью данного исследования явилось изучение фосфорилирования и гликозилирования индивидуальных субъединиц РНК-полимеразы III млекопитающих *in vivo*. Холофермент ДНК-зависимая РНК-полимераза III была выделена из клеток эпидермоидной карциномы человека А431, плаценты человека и фибробластов мыши 3Т3 в виде двух субфракций, различающихся по порядку элюции с колонки ДЭАЭ-Сефадекс А-25 и плавучей плотности в градиенте концентрации глицерина.

Присутствие модификаций в индивидуальных субъединицах фермента определяли методом иммуноблоттинга с антителами против фосфосерин/треонина и N-О-ацетилглюкозамина после диск-электрофореза в 4.5—9.0%-ном ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия. Для точного определения молекулярных масс модифицированных полипептидов использовали набор стандартных белков (Sigma, США). Показано, что субъединицы обеих субфракций РНК-полимеразы III клеток человека с мол. массами 60, 52 и 45 кДа фосфорилированы и гликозилированы. В составе субфракций РНК-полимеразы III фибробластов мыши линии 3Т3 фосфорилированными и гликозилированными оказались субъединицы с мол. массами 49, 45 и 42 кДа. Лишь субъединицы с мол. массой 60 и

45 кДа в составе РНК-полимеразы III человека и субъединицы 49 и 42 кДа РНК-полимеразы III мыши, согласно данным Сентенака (1985) и Скляра (1976), могут быть отнесены к собственно РНК-полимеразе III. То, что эти субъединицы являются объектами посттрансляционных модификаций, позволяет предположить их сходную функциональную нагрузку в составе ферментов из различных организмов. Функциональная роль этих субъединиц в составе фермента в настоящее время не установлена. Интересным представляется тот факт, что посттрансляционным модификациям подвержены субъединицы, которые не входят в идентифицированный в составе РНК-полимеразы III коровый домен, состоящий из пяти субъединиц 160, 128, 40, 23 и 19 кДа (Geiduschek, Kassavetis, 2001), и в идентифицированный в РНК-полимеразе III дрожжей субдомен, ответственный за терминацию и реинициацию транскрипции и состоящий из полипептидов 53, 37 и 11 кДа (Landrieux et al., 2006).

НОКАУТ ГЕНА ИНТЕГРИНА БЕТА 1 В ЭМБРИОНАЛЬНОМ ХРУСТАЛИКЕ БЛОКИРУЕТ АКТИВАЦИЮ ПРОТЕИНКИНАЗЫ ФОКАЛЬНЫХ КОНТАКТОВ И ЕЕ ТРАНСЛОКАЦИЮ В ЯДРО. © В. Н. Смирский,¹ М. К. Дункан.² ¹Институт биологии развития им. Н. К. Колыцова РАН, Москва, и ²University of Delaware, Newark DE, 19716 USA.

В ходе дифференцировки клеток эпителия хрусталика в волокна происходит активная транслокация регуляторных белков из цитоплазмы в клеточное ядро и обратно. Тирозиновая протеинкиназа фокальных контактов (ФАК) исходно локализована на плазматической мембране в комплексе с бета-субъединицей интегрин. Под действием ростовых факторов и после кластеризации интегринных рецепторов ФАК активируется путем фосфорилирования и перемещается в ядро, принимая участие в контроле клеточной миграции, пролиферации и дифференцировки. Мы исследовали экспрессию и локализацию нефосфорилированной и фосфорилированной (рФАК) форм ФАК до и после тканеспецифического нокаута гена интегрин бета 1 (Itgb1) в хрусталике зародышей и новорожденных мышей. Кроме того, изучали экспрессию генов, кодирующих трансформирующий фактор роста TGFbeta2 и его рецепторы. Использовали ПЦР, ПЦР в реальном времени и иммунофлуоресценцию.

У 12.5-суточных зародышей дикого типа ФАК локализована в цитоплазме клеток эпителия и первичных волокон хрусталика, что совпадает с локализацией Itgb1. Через 14.5 сут ФАК сохраняется преимущественно в волокнах хрусталика вдоль их плазматических мембран. Через 16.5 сут и у новорожденных мышей уровень ФАК возрастает в эпителии и снижается в волокнах, сохраняясь на высоком уровне только в наименее дифференцированных волокнах поверхностных слоев хрусталика. После нокаута локализация ФАК в клетках 12.5-суточного хрусталика не изменяется (несмотря на отсутствие Itgb1), однако у 14.5-суточных зародышей происходит резкое увеличение уровня ФАК в цитоплазме клеток эпителия при одновременном снижении его в волокнах хрусталика.

рФАК локализована в ядрах первичных (12.5 сут) и вторичных (14.5—16.5 сут) волокон хрусталика. После нокаута локализация рФАК в 12.5-суточном хрусталике остается неизменной, однако на сроке 14.5 сут развития рФАК в ядрах клеток хрусталика не детектируется. Через

16.5 сут она снова появляется в ядрах волокон на уровне, сопоставимом с уровнем в хрусталике дикого типа. В ядрах волокон хрусталика новорожденных мышей рФАК не выявляется как в норме, так и после нокаута.

С помощью ПЦР в реальном времени показано, что после нокаута экспрессия TGFbeta2 в 14.5-суточном хрусталике возрастает в 1.3 раза, тогда как экспрессия его рецептора TGFbetaR2 снижается в 4 раза. Это совпадает по времени с исчезновением рФАК из ядер волокон хрусталика, что позволяет сделать предположение о роли TGFbeta2 в регуляции фосфорилирования ФАК.

Таким образом, дифференцировка клеток эпителия эмбрионального хрусталика в волокна сопровождается появлением в ядрах волокон рФАК. Тканеспецифический нокаут гена Itgb1 в хрусталике приводит к временному исчезновению рФАК из ядер волокон и нарушению их дифференцировки. Эти данные свидетельствуют об участии Itgb1 в активации (фосфорилировании) ФАК.

ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА Pou5F1/Oct4 И РЕТРОГЕНА Pou5F1B/Oct4-pg1 В СЕТЧАТКЕ ЭМБРИОНАЛЬНОГО ГЛАЗА И ГЛАЗА ВЗРОСЛОГО ЧЕЛОВЕКА. © Ю. А. Смирнова, Н. В. Фирсова, Ю. В. Маркутантова, Р. Д. Зиновьева. Институт биологии развития им. Н. К. Колыцова РАН, Москва, konchan@yandex.ru.

Один из механизмов возникновения псевдогенов — ретропозиция, включение в геном ДНК-копий процессированной мРНК. Псевдогены, не содержащие интронов и регуляторных участков, выделяются в группу процессированных псевдогенов (ППГ). Имеются данные о том, что некоторые ППГ транскрипционно активны и выполняют тканеспецифические функции, а также регулируют экспрессию собственных генов-предшественников (Korneev et al., 1999; Yano et al., 2004). Известна и обратная ситуация: ретроген e(y)2 выполняет универсальную функцию и экспрессируется во всех тканях, в то время как исходный ген функционален в небольшой группе специализированных клеток (Krasnov et al., 2005). Ранее нами была идентифицирована экспрессия ретрогена Pou5F1B/Oct4-pg1 в тканях глаза человека в ходе пренатального развития (Фирсова и др., 2008). Известно, что транскрипционный фактор Pou5F1/Oct4 играет важнейшую роль в поддержании плюрипотентного статуса и самообновлении ЭСК. Семейство генов Pou5F1/Oct4 включает в себя шесть псевдогенов. Показано, что два ретрогена, локализованных у человека на хромосомах 10 (Oct4-pg5) и 8 (Oct4-pg1), экспрессируются в раковых опухолях и клеточных линиях (Suo et al., 2005). Материалом наших исследований служили сетчатка плодов человека с 9.5 по 22 нед пренатального развития и сетчатка взрослого человека (postmortem). Эмбриональный материал получали из НИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В. И. Кулакова. С помощью ПЦР-анализа со специфическими для гена и ретрогена праймерами и иммуногистохимии получены данные об экспрессии транскрипционного фактора Pou5F1/Oct4 и ретрогена Pou5F1B/Oct4-pg1 в развивающейся сетчатке и сетчатке взрослого человека. Данные иммунохимии свидетельствуют о ядерной локализации белковых продуктов. Наблюдается индивидуальная изменчивость экспрессии исследуемых генов, что может быть связано с аномалиями развития и возрастными изменениями в сетчатке. Предполагается, что транскрипты ретрогена Pou5F1B/Oct4-pg1 могут принимать участие в

регуляции экспрессии гена-предшественника и, таким образом, участвовать в регуляции процессов самообновления и дифференцировки мультипотентных клеток в сетчатке глаза.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00462) и программы президиума РАН «Биоразнообразие».

ПРИНЦИПЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ХРОМОСОМНЫХ ЛОКУСОВ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ТРЕХМЕРНУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ ИНТЕРФАЗНОГО ЯДРА. © В. Н. Стегний, Г. Н. Артемов, А. О. Сайджафарова, К. Е. Усов. Томский государственный университет, center_cu@res.tsu.ru.

Ранее было установлено, что архитектура ядер генеративной ткани у ряда представителей Diptera имеет видовую специфику (Стегний, 1979, 1993), связанную с динамикой хромосомы и отношений хромосомы с ядерной оболочкой. Выявлен молекулярный состав ДНК хромосомных локусов, участвующих в прикреплении к ядерной оболочке в трофоцитах яичников у четырех видов малярийных комаров комплекса «*Anopheles maculipennis*» и девяти видов подгруппы *melanogaster* рода *Drosophila*, для которых характерна сильная межвидовая динамика хромосомы. Методом микродиссекции локусов прикреплений к ядерной оболочке хромосом XL, 2L и 2R у малярийных комаров и хромосомы *D. oreana* с последующим секвенированием и анализом библиотеки клонов ДНК было выяснено следующее.

У малярийных комаров: 1) молекулярный состав в данных локусах представлен в основном мобильными элементами, последовательностями S/MAR, последовательностями, взаимодействующими с белками ядерного матрикса, ядерной ламины, синаптонемаляльного комплекса и в меньшей степени различными тандемными повторами, сателлитами и функциональными генами; 2) наряду с отрядо- и родоспецифичными последовательностями ДНК выявлены и видоспецифичные последовательности ДНК из локусов прикреплений; 3) ДНК районов прикреплений хромосом находится в основном в β -гетерохроматине и реже в α -гетерохроматине.

У дрозофилы: 1) молекулярный состав ДНК из хромосомы представлен повторными последовательностями (представителями LTR-ретротранспозонов, LINE-элементов, DNA-транспозонов и сателлитной ДНК), а также включает в себя гены; 2) имеются последовательности, общие для гетерохроматина хромосомы трофоцитов яичников *D. oreana* и прицентромерных районов хромосом X, 2 и 3 трофоцитов яичников всех видов подгруппы *melanogaster* и субтеломерного района хромосомы 3 *D. erecta*; выяснено, что этими консервативными последовательностями являются преимущественно различные повторные последовательности ДНК, а также гены; 3) несмотря на межвидовые различия во взаимном расположении первичных политенных хромосом трофоцитов у видов подгруппы *melanogaster*, распределение районспецифичной ДНК-пробы консервативно в плане ее локализации преимущественно в прицентромерных районах хромосом; 4) районы прицентромерного гетерохроматина хромосом трофоцитов у видов подгруппы *melanogaster* различались по количеству гомологичных районспеци-

фичной ДНК-пробе последовательностей; 5) у *D. oreana* в ядрах трофоцитов с ретикулярной структурой районспецифичная ДНК-проба распределялась преимущественно в пределах локальной территории в пространстве ядра, в то время как у всех остальных видов подгруппы *melanogaster* проба распределялась диффузно по всему ядру, и это свидетельствует о том, что хромосомы трофоцитов *D. oreana* не деконденсируются в ядрах с ретикулярной структурой.

Исследования проводились при финансовой поддержке ФЦП № П-801, ФЦП № П-1702, ЦП «Развитие научного потенциала высшей школы» (проект 2.1.1./774) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-01059).

ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ЯДЕРНОГО БЕЛКА Piwi В ГЕРМИНАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ. © О. А. Соколова, М. С. Кленов, Е. Ю. Якушев, Е. А. Михалева, В. А. Гвоздев. Институт молекулярной генетики РАН, Москва.

Белки, принадлежащие к семейству PIWI, участвуют в формировании и самообновлении стволовых клеток зародышевого пути, а также в подавлении экспрессии генов по механизму РНК-интерференции (сайленсингу) у различных животных, включая млекопитающих. В ходе сайленсинга короткие РНК в составе рибонуклеопротеиновых комплексов способны узнавать комплементарные последовательности РНК в клетке и катализировать их разрезание, что приводит к деградации РНК или транскрипционной репрессии гена в ядре. Белки Piwi связывают короткие РНК особого типа, которые были названы Piwi-interacting RNA (piRNA). piRNA в основном комплементарны мобильным элементам (транспозонам) и повторным последовательностям генома. Таким образом, белки семейства Piwi осуществляют репрессию мобильных элементов, обеспечивая целостность генома и защиту от транспозиций.

Drosophila melanogaster обладает тремя белками, относящимися к семейству Piwi (Piwi, Aub и Ago3), один из которых (собственно Piwi) локализуется в ядрах клеток яичников, тогда как два других (Aub и Ago3) — в цитоплазме. Отсутствие любого из этих белков приводит к резкому увеличению экспрессии мобильных генетических элементов. Мухи, содержащие нуль-мутацию в гене *piwi*, имеют, кроме того, неразвитые яичники вследствие дефектов в процессах деления герминальных стволовых клеток. В этой работе мы исследовали мутантный белок Piwi (PiwiNt), в котором сохранены домены, осуществляющие связывание коротких РНК и расщепление РНК-мишени, однако отсутствует N-конец, предположительно содержащий сигнал ядерной локализации. Мы показали, что PiwiNt локализуется не в ядре, а в цитоплазме герминальных клеток яичников. У *piwiNt*-мутантных мух мы обнаружили значительную дерепрессию различных ретротранспозонов, аналогичную эффекту нуль-мутаций в гене *piwi*, причем накопление транскриптов мобильных элементов происходило как в ядрах, так и в цитоплазме. Таким образом, транспорт белка Piwi в ядро необходим для нормального функционирования системы сайленсинга транспозонов с помощью piRNA. Интересно, что в отличие от нуль-мутаций гена *piwi* *piwiNt*-мутанты не имеют нарушений деления герминальных стволовых клеток. Таким образом, мы предполагаем, что функция белка Piwi

в процессе поддержания стволовых клеток не связана с сайленсингом транспозонов.

ЗАРАЖЕНИЕ МИКРОСПОРИДИЯМИ ВЕДЕТ К БЛОКАДЕ ФРАГМЕНТАЦИИ ХРОМАТИНА И ДРУГИМ ПРОЯВЛЕНИЯМ ИНДУЦИРОВАННОГО АПОПТОЗА В МАКРОФАГАХ. © Ю. Я. Соколова,¹ Е. С. Дидье.² ¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия, и ²Национальный центр по изучению приматов, Tulane University, Covington, USA.

Переключение зараженных клеток на апоптоз (А) рассматривается как защитный клеточный механизм, направленный против пролиферации и распространения патогенов. Многие внутриклеточные паразиты в процессе эволюции выработали способы модуляции апоптозного каскада. Вирусы и бактерии часто стимулируют переход инфицированной клетки к А, однако для большинства эукариот (*Theileria*, *Cryptosporidium*, *Toxoplasma*, *Trypanosoma* и др.), наоборот, подавление А считается наиболее типичным сценарием. Микроспоридии, эукариоты, родственные грибам, — широко распространенные внутриклеточные паразиты животных разных уровней организации. У человека эти патогены вызывают опасные оппортунистические инфекции, главным образом связанные с иммунодефицитом. Совершенные адаптации микроспоридий к внутриклеточному паразитизму широко известны, однако их воздействие на А клетки хозяина практически не изучалось. Макрофаги человека ТНР-1 дифференцировали добавлением форбол-миристан-ацетата (РМА). Клетки заражали спорами двух видов микроспоридий — *Encephalitozoon cuniculi* и *Vittaforma corneae*. Апоптоз индуцировали стауроспорином. В качестве контроля использовали как незараженные культуры, так и культуры, инкубированные с убитыми кипячением спорами микроспоридий. Влияние заражения на количество ядер с характерными чертами А предварительно оценивалось в 96-луночных планшетах визуальным наблюдением живых клеток, окрашенных бромистым этидием и акридиновым оранжевым, во флуоресцентном микроскопе. Для более строгой количественной оценки применяли метод колориметрический TUNEL (DeadEnd Colorimetric TUNEL System, Promega, Madison WI) с последующим микроскопированием в светлом поле. Для сравнительной оценки состояния ядер в индивидуальных зараженных и интактных клетках использовали флуориметрический TUNEL (In Situ Cell Death Detection kit, TMR-red, Roche, Indianapolis, IN) в сочетании с окраской спор поликлональными антителами и конфокальную микроскопию. Уровень транскрипции генов, кодирующих про- и антиапоптозные белки, и тестировался методом количественной ПЦР в реальном времени (qRT-PCR). Число TUNEL-положительных (апоптозных) ядер было незначительно выше в макрофагах, зараженных живыми или убитыми спорами, по сравнению с фоновым уровнем апоптозных ядер в контроле. Индукция А стауроспорином привела к почти 2-кратному увеличению числа положительных ядер в популяции макрофагов, зараженных живыми спорами, 5-кратному — в незараженных и 9-кратному — в клетках, инкубированных с мертвыми спорами. Измерение активности каспазы 3 подтвердило тенденцию: индукция стауроспорином вызывала 4-кратное возрастание активности фермента в неинфицированных клетках и только 2-кратное — в клетках, зараженных живыми спорами. Наблюдение

индивидуальных клеток в конфокальном микроскопе выявило различие в характере воздействия двух видов микроспоридий на проявления А. В клетках, содержащих споры и стадии *E. cuniculi*, ядра никогда не окрашивались методом TUNEL; заражение же *V. corneae* не исключало фрагментации хроматина и положительного окрашивания ядер зараженных клеток. Анализ транскрипции 50 генов, кодирующих белки, участвующие в регуляции апоптозного каскада клеток человека, методом qRT-PCR показал значительное снижение транскрипции многих проапоптозных генов (генов каспаз 1—10, генов семейства Bcl-2 и др.) и, наоборот, повышение транскрипции антиапоптозных генов (Bax, P-53 и др.) в популяциях клеток, зараженных живыми, но не убитыми спорами. Таким образом, результаты наших исследований говорят о том, что микроспоридии способны подавлять индуцированный апоптоз в макрофагах. Более детальный анализ полученных данных, а также дальнейшие эксперименты позволят выявить механизмы этого явления.

СОЗДАНИЕ АВТОМАТИЧЕСКОГО КЛАССИФИКАТОРА ХРОМОСОМ ДОМАШНЕЙ СВИНЬИ. © В. Н. Стефанова,¹ М. Н. Зенина,² Е. И. Клыкова.² ¹ГНУ ВНИИ генетики и разведения с.-х. животных РАСХН, Санкт-Петербург—Пушкин и ²ООО «Видео ТестТ», Санкт-Петербург.

Необходимость использования компьютерных анализаторов изображений для анализа и идентификации хромосом при проведении цитогенетического мониторинга очевидна. К сожалению, до сих пор не разработаны программы автоматического распознавания хромосом домашних животных. Для домашней свиньи основную часть зарегистрированных хромосомных aberrаций у племенных животных составляют реципрокные транслокации. Все животные-носители реципрокных транслокаций характеризуются сниженной воспроизводительной способностью за счет пренатальной гибели эмбрионов с несбалансированными кариотипами, что и обуславливает необходимость их выявления и выбраковки. Выявление реципрокных транслокаций возможно только на GTG-окрашенных хромосомах домашней свиньи. Поэтому задачей нашей работы было создание автоматического классификатора хромосом свиньи.

Препараты GTG-окрашенных хромосом свиньи анализировали на программно-аппаратном комплексе, состоящем из микроскопа, CCD-камеры высокого разрешения, компьютера и оригинального компьютерного обеспечения «Видео ТестТ — Карио 3.1» (ООО «Видео ТестТ»). На этапе создания автоматического классификатора в ручном режиме были откорректированы, идентифицированы и добавлены в классификатор 1578 GTG-окрашенных хромосом домашней свиньи разной степени конденсации из 47 метафазных пластинок с хорошим разрешением хромосом. Были построены кариограммы хромосом домашней свиньи согласно общепризнанной номенклатуре. Правильность работы созданного классификатора проверяли на выборке из 16 метафазных пластинок от других животных. В среднем число ошибочно распознанных хромосом было равно 3.12 ± 0.26 , частота ошибочного распознавания составляла 8.2 %. Эти показатели сопоставимы с аналогичными показателями для классификаторов хромосом человека, используемых в медицинских исследованиях. Для разных хромосом частота ошибочного распознавания значительно варьировала: от безошибочного распо-

завания (хромосомы 1, 6, 11, 13, 15 и Y) до частоты 20 % (хромосома 8). Апробацию созданного классификатора провели также на препаратах хряка с *ger(1p-;11p+)*, обнаруженного нами ранее. При этом автоматическая идентификация хромосом, в том числе и вовлеченных в транслокацию, была проведена правильно.

Необходимо подчеркнуть, что программа «Видео Тест — Карио 3.1» позволяет оператору проводить ручную коррекцию ошибок на всех этапах кариотипирования (метафаза, анализ и кариограмма) и дополнять полученный классификатор хромосом в случае необходимости.

Таким образом, созданный нами классификатор автоматического распознавания хромосом домашней свиньи может быть использован в цитогенетическом мониторинге племенных животных, а также для идентификации хромосомных перестроек в перевиваемых клеточных линиях свиньи, широко используемых в биологических и медицинских исследованиях.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯТОРНАЯ ФУНКЦИЯ НЕ КОДИРУЮЩИХ БЕЛКИ ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ ДНК. © И. О. Сучкова, Л. К. Сасина, Е. В. Пицик, Е. М. Федорова, К. В. Соловьев, Е. П. Паткин. НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург.

В настоящее время установлено, что в сравнении с одноклеточными и беспозвоночными млекопитающие обладают более сложной комплексной организацией генома, которая является результатом накопления повторяющихся элементов и некодирующих последовательностей (Lander et al., 2001). Некоторые из наиболее известных доменов, содержащих повторы, в хромосомах высших эукариотов являются тандемными сателлитными повторами, включая мини-сателлиты (Vergnaud, Denoeud, 2000) или микросателлиты (Usdin, 2008). В настоящее время не кодирующие белки повторяющиеся последовательности ДНК и РНК считаются возможными регуляторами генной активности, что показано для инактивации X-хромосомы млекопитающих (Heard, 2004), импринтинга (Ohlsson et al., 1998) и парамутаций (Chandler, Stam, 2004). На регуляторную роль таких повторов указывают многочисленные примеры ассоциаций между полиморфизмом тандемных повторов и различными комплексными патологиями человека. Однако ткане-, орган- и клеточная специфичность тандемных повторов и механизмы их действия в таких процессах остаются неясными. Они могут быть обусловлены изменением величины повторов, наличием SNP, а также эпигенетическими механизмами, включающими в себя некодирующую РНК (Kreiman, 2004), модификации хроматина и метилирование ДНК (Verdel et al., 2004), пространственную организацию ядра, локализацию хромосом и физический контакт между ними (Fraser, Vickmore, 2007), гетерохроматинизацию (Saveliev et al., 2003). В качестве трансфакторов могут служить как общие, так и специфичные ТФ, связывание которых может быть обусловлено не только последовательностями ДНК, но и структурой хроматина. Возможна кооперативная регуляция несколькими транскрипционными факторами, которые образуют дисрегуляторные модули (Sharan et al., 2004). Ранее мы нашли связь межаллельных различий интронного мини-сателлита UPS29 гена ACAP3 с болезнью Паркинсона и эпилепсией, а 5-НТТ VNTR связан с психиатрическими заболеваниями, но механизм такой связи не-

ясен. Мы использовали репортерные конструкции на основе GFP и LacZ и несущие различные аллели данных мини-сателлитов, трансфицированные в клетки эмбриональной карциномы F9. Обнаружено, что число сигнал-положительных клеток и величина флуоресценции зависят от числа повторов в конструкции. При этом на эти показатели влияло наличие дополнительных ТФ CTCF и YB-1, экспрессируемых котрансфицированными плазмидами, что указывает на эпигенетическую природу регуляции со стороны данных мини-сателлитов. В пользу этого говорит и то, что выявляемость при помощи FISH внутриинтронного UPS29 в клетках крови резко отличалась от таковой для межгенного мини-сателлита MS32, хотя их первичная структура и величина сходны. Был также исследован другой мини-сателлит B2VNTR из 3'-UTR гена рецептора брадикинина *BDKRB2*, длинный аллель которого действует как потенциальный негативный регулятор экспрессии на претрансляционном уровне. Для данного VNTR мы не нашли ассоциаций межаллельных различий и SNP с артериальной гипертензией у подростков и коронарной недостаточностью. Но у пациентов с коронарной недостаточностью гетерозиготных по B2VNTR обнаружено наличие метилированных обоих аллелей B2VNTR. Таким образом, можно предположить, что механизм негативного влияния B2VNTR на экспрессию гена *BDKRB2* при коронарной недостаточности, скорее всего, имеет эпигенетическую природу, т. е. некодирующие тандемные ДНК-повторы могут осуществлять регуляции экспрессии генов с использованием различных эпигенетических механизмов.

ОСОБЕННОСТИ ОКРАСКИ ГЕТЕРОХРОМАТИНОВЫХ РАЙОНОВ ХРОМОСОМ ХОРИОНА ЧЕЛОВЕКА АКРИДИНОВЫМ ОРАНЖЕВЫМ. © И. Л. Трофимова,^{1,2} М. С. Ляпунова,¹ Е. В. Жолнерович,¹ Т. В. Кузнецова,² В. С. Баранов.² ¹С.-Петербургский государственный университет и ²НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта СЗО РАМН, Санкт-Петербург, irina311@inbox.ru.

Наше исследование является продолжением цикла работ по изучению особенностей гетерохроматиновых районов (ГХР) хромосом в цитотрофобласте хориона (ЦТХ). Приготовление препаратов из образцов, полученных после прерывания беременности в срок 5—10 нед по медицинским (остановка развития плода) и социальным показаниям, осуществляли прямым и полупрямым (после инкубирования образца в питательной среде в течение 24—96 ч) методами. Были использованы также стандартные препараты хромосом из ФГА-стимулированных лимфоцитов периферической крови взрослых и пуповинной крови плода в срок 20—23 нед беременности. Окрашивание препаратов проводили с помощью акридинового оранжевого (АО). Как известно, АО специфически связывается с двух- и одноцепочечными нуклеиновыми кислотами и флуоресцирует в зеленой и красной областях спектра соответственно. АО используется для дифференциальной окраски хромосом (RBA, RFA), предполагающей этапы предобработок, тогда как без предобработок все хромосомы обычно окрашиваются относительно монотонно в желто-оранжевый цвет.

При окрашивании препаратов из культур лимфоцитов, как и ожидалось, не было выявлено дифференциальной исчерченности хромосом, которые имели монотонную зелено-желтую окраску. Однако в некоторых мета-

фазных пластинках в нескольких образцах была обнаружена красная флуоресценция района 9qh. При окрашивании препаратов из ЦТХ наблюдалась красная флуоресценция районов 1qh, 9qh, 16qh, 15cenh, 22cenh и Yqh, тогда как плечи всех хромосом набора окрашивались в желто-зеленый цвет. На характер окраски не оказывали влияния способы приготовления препаратов из хориона (длительность инкубирования образца, мацерация образца в 60%-ной уксусной кислоте, механическая дезагрегация до и после фиксации), концентрация и фирма-производитель АО, состав и pH буферных растворов, длительность и условия хранения препарата.

Для выяснения природы наблюдаемого феномена был проведен ряд экспериментов по обработке препаратов нуклеазами (РНКаза А и РНКаза Н). После предобработок препаратов РНКазой А в большинстве метафазных пластинок на препаратах из ЦТХ интенсивность красной флуоресценции в ГХР снижалась, особенно в районе 1q12. В части метафазных пластинок наблюдалась дифференциальная окраска хромосом, аналогичная RFA. После предобработок РНКазой Н в районе 1q12 было зарегистрировано отсутствие флуоресценции («черные дыры») при незначительном снижении красной флуоресценции в ГХР других хромосом. В контроле (при обработке препаратов только соответствующими буферными растворами) сохранялся тип окраски, характерный для нативных препаратов. При аналогичных обработках препаратов из культур лимфоцитов, а также в контроле тип окраски соответствовал исходному (т. е. относительно монотонная зелено-желтая флуоресценция по всей длине хромосомы).

Природа и механизмы избирательной окраски ГХР хромосом только в ЦТХ с помощью АО требуют дальнейшего изучения. Остается неясным и феномен нестабильной избирательной окраски АО района 9q12 в ФГА-стимулированных лимфоцитах. Вместе с тем полученные нами данные о чувствительности к РНКазам не только указывают на особую конформационную укладку ГХР, но и служат косвенным подтверждением транскрипционной активности сателлитных ДНК в спонтанно делящихся клетках цитотрофобласта.

АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНОГО СОСТАВА ДНК ХРОМОЦЕНТРА ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ ТРОФОЦИТОВ *DROSOPHILA ORENA* (DIPTERA, *DROSOPHILIDAE*).
© К. Е. Усов, Т. А. Шелковникова, В. Н. Стегний. НИИ биологии и биофизики при Томском государственном университете, gene@res.tsu.ru.

Геном эукариот состоит из двух компонентов, хорошо различимых как на цитологическом, так и на молекулярном уровнях, — гетерохроматина и эухроматина. Если эухроматиновая часть генома различных организмов изучается уже на протяжении длительного времени, то гетерохроматин наиболее интенсивно начали изучать в последнее десятилетие в связи с изменением представления о нем как о своеобразном «пустыре» генома. В настоящее время ведется работа по секвенированию ДНК гетерохроматиновой части геномов многих организмов. Так, например, определенный успех был достигнут в расшифровке первичной последовательности гетерохроматина *Drosophila melanogaster* (Carvalho et al., 2002; Smith et al., 2007). Этот вид входит в состав подгруппы *melanogaster*, которая включает в себя девять близкородственных видов.

Анцестральным видом для всей подгруппы *melanogaster* является вид *D. oreana* (Стегний, Вассерлауф, 1994). Сейчас ведутся работы по секвенированию геномов многих видов данной подгруппы (Clark et al., 2007). Среди видов этой подгруппы особняком стоит вид *D. oreana*, геном которого значительно больше, чем геномы всех остальных видов подгруппы, в основном за счет повышенного содержания гетерохроматина. В то время как другие виды подгруппы *melanogaster* интенсивно изучаются, вид *D. oreana* остается практически неизученным, данные о последовательностях его генома в литературе отсутствуют. Известно, что гетерохроматин в ядрах трофоцитов яичников *Drosophila* представлен в гораздо большей степени, чем в соматических тканях (Mal'ceva, Zhimulev, 1993). Таким образом, изучение состава ДНК хромосом трофоцитов яичников *D. oreana* может дать общее представление об организации гетерохроматина у этого вида.

Методом микродиссекции с последующей DOP-ПЦР была получена районспецифичная библиотека ДНК хромосом трофоцитов *D. oreana*.

Материал ДНК-библиотеки был клонирован в плазмидном векторе. В результате был получен набор клонов. Далее определили первичную последовательность у 76 клонов. Известно, что короткие tandemные повторы и уникальные последовательности являются одним из основных составляющих компонентов гетерохроматина (Smith et al., 2007). Все клоны библиотеки были проанализированы на наличие tandemных повторов при помощи программы «Tandem Repeats Finder» Program Version 4.00 (Benson, 1999). В результате внутри 4 клонов были найдены tandemно повторенные последовательности длиной от 14 до 38 п. н. Обнаруженные в составе клонов библиотеки tandemные повторы относятся к мини-сателлитам согласно классификации tandemных повторов, приведенной в работе Ванга с соавторами (Wang et al., 2008). В целом надо сказать, что tandemные повторы могут составлять огромные по протяженности участки хромосом и гетерохроматина, но тем не менее они были обнаружены только внутри 4 из 76 проанализированных клонов библиотеки. Возможно, это связано с тем, что у *D. oreana* короткие tandemные повторы не занимают таких обширных участков гетерохроматина, как у *D. melanogaster*. Кроме того, был осуществлен поиск гомологий ДНК-клонов библиотеки *D. oreana* с известными уникальными последовательностями из геномов других видов подгруппы *melanogaster* с помощью программы «BLAST» в базе данных «FlyBase». В результате 4 клона библиотеки хромосом трофоцитов *D. oreana* оказались гомологичными нескольким аннотированным генам, принадлежащим разным видам подгруппы *melanogaster*. Среди этих генов наиболее изученными являются *DIP1* и *Vulcan*, которые первоначально были обнаружены в геноме *D. melanogaster*. Впоследствии ортологи *DIP1* и *Vulcan* были найдены у позвоночных и беспозвоночных животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 10-04-01059 и 2.1.1/774).

ИМПРИНТИНГ ГОМОЛОГИЧНОЙ ХРОМОСОМЫ У *DROSOPHILA MELANOGASTER*. © Н. Б. Федорова, Е. В. Чадова, Е. А. Хоцкина, Б. Ф. Чадов. Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск.

Генетическим импринтингом называют изменение активности гена и передачу этого изменения через гаметы потомку. Типичным примером импринтинга является разница в активности аллеля у потомка в зависимости от пола родителя — донора аллеля. Свойством быть импринтированными обладают не все, а только отдельные гены. Здесь сообщается о новой форме импринтинга — передаче изменения генной активности, вызванного хромосомной перестройкой в гомологичной хромосоме.

С 2000 г. на *Drosophila melanogaster* авторы занимаются получением и изучением свойств мутаций, называемых условными. Характерным свойством мутаций является проявление мутации в одном генотипе и не проявление в другом. Путем гамма-облучения с последующим специальным отбором была получена очередная группа мутаций в хромосоме 2 дрозофилы. Формально мутации представляют собой рецессивные летали в этой хромосоме. Одна из мутаций имела видимое доминантное проявление и получила название «бочонок» (*Small barrel*, кратко *Smba*).

Мутация *Smba* в гетерозиготе с инвертированной хромосомой *In(2LR)Cy* вызывает резкое уменьшение длины куколки и имаго. В гомозиготе мутация летальна. Скрещивание мутантной хромосомы *Smba* с набором из 104 делеций хромосомы 2 показало, что мутантная хромосома имеет три дефекта: один расположен в районе 35 левого плеча, второй и третий — в районах 54 и 55 правого плеча. Сочетания *Smba* с хромосомами, делетированными по этим районам, летальны. Летальность не зависела от направления скрещивания.

Мутация *Smba* в гетерозиготе с инвертированной хромосомой *In(2LR)Pm* не проявляется. Причина — замена инверсионной хромосомы *In(2LR)Cy* на хромосому *In(2LR)Pm*, имеющую другие точки разрывов. При нахождении хромосомы *Smba* в составе компаунда *Smba/In(2LR)Pm* изменяется и ее взаимодействие с делециями хромосомы 2. Хромосома *Smba* продолжает оставаться летальной в сочетании с делециями районов 35 и 55, но перестает быть летальной с делециями района 54 (5 делеций). Потеря летальности не зависит от направления скрещивания.

Полученные результаты показывают, что проявление мутантного дефекта в районе 54 хромосомы *Smba* зависит от того, какова структура оппозитного гомолога у родителя. Дефект проявляется, если оппозитный гомолог содержит хромосому *In(2LR)Cy*, но не проявляется, если оппозитный гомолог содержит хромосому *In(2LR)Pm*. Проявление — не проявление *Smba* в зависимости от типа инверсии происходит не у самих обладателей мутации (особи *Smba/In(2LR)Cy* и *Smba/In(2LR)Pm*), а у их потомков, т. е. имеет место типичный генетический импринтинг. В отличие от классического импринтинга, где импринтирующим фактором является половая принадлежность особи, в данном случае им является структура гомолога.

Проявление мутации *Smba* имеет и другие особенности. К ним относится родительский эффект мутации. Все гибриды первого поколения *Smba/In(2LR)Cy* имеют фенотип *Smba*, хотя половина из них не получает хромосомы *Smba*. В скрещивании *Smba/In(2LR)Cy* × *Smba/In(2LR)Pm* потомки *Cy/Pm* имеют фенотип *Smba*, хотя они не содержат мутации. При разведении особей *Cy/Pm* «в себе» из поколения в поколение часть потомков сохраняет мутантный фенотип. Мутация, таким образом, показывает способность к образованию длительной модификации по своему образу и подобию. Приведенные данные свиде-

тельствуют о формировании мутантного признака у особи в условиях отсутствия у нее соответствующей мутантно измененной ДНК матрицы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00094).

НИКОТИНАМИДАДЕНИНДИНУКЛЕОТИД (НАД) ИЗМЕНЯЕТ УРОВНИ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ—ДЕФОСФОРИЛИРОВАНИЯ ГИСТОНА H2AX В КЛЕТКАХ МИОКАРДА МЫШЕЙ C57BL/6 ПОСЛЕ РЕНТГЕНОВСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ. © Д. В. Фирсанов, В. М. Михайлов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Двухнитевые разрывы (ДР) ДНК считаются наиболее опасными повреждениями генома и могут приводить к апоптотической гибели клеток и возникновению неопластической трансформации. При возникновении ДР ДНК в клетках запускается каскад реакций, направленный на узнавание этих повреждений и их репарацию. Одним из ранних этапов этого каскада является фосфорилирование вариантного корового гистона H2AX в мегабазных доменах хроматина с образованием дискретных фокусов гамма-H2AX в местах ДР, что приводит к амплификации сигнала и рекрутированию белков репарации в места ДР. Известно, что при возникновении повреждений ДНК происходит активация полимераза поли-АДФ-рибозы (PARP), которая рибозилирует белки хроматина в месте повреждения ДНК при участии НАД. Существуют предположения, что в клетках во время репарации ДНК после рентгеновского облучения (РО) происходит конкуренция за внутриклеточный НАД, который интенсивно используется PARP.

В нашей работе мы исследовали влияние экзогенного НАД на динамику образования, накопления и элиминацию гамма-H2AX как маркера ДР ДНК в клетках миокарда и кардиомиоцитах мышей C57BL/6 после РО. Известно, что кардиомиоциты являются терминально дифференцированными клетками и не вступают в пролиферацию при повреждении миокарда. Это обстоятельство значительно облегчает учет репарации ДНК на фоне отсутствия репликативного синтеза ДНК. При помощи иммунологических методов исследования (метод ПАП и Вестерн-блоттинг) нами были получены данные о том, что экзогенный НАД увеличивает уровень накопления гамма-H2AX в клетках миокарда через 20 мин после РО в дозе 3 Гр. При введении мышам НАД в дозе 3.8 мг/кг сразу же после РО в дозе 3 Гр через 20 мин мы наблюдали в миокарде ~53 % гамма-H2AX-положительных ядер по сравнению с РО в той же дозе контрольными животными (~43 %). Через 1 ч после облучения наблюдалось быстрое снижение этого уровня фосфорилирования H2AX (~16 %) до величин ниже уровня облученного контроля (~27 %). При инъекции НАД в дозе 37.5 мг/кг мы также наблюдали значительное увеличение гамма-H2AX-положительных ядер (~82 %), однако через 1 ч после РО количество гамма-H2AX-положительных ядер оставалось существенно выше положительного контроля и составляло ~45 %. Данные, полученные с помощью методики иммуноблоттинга, в целом коррелируют с нашими иммуноморфологическими данными о влиянии НАД на накопление и элиминацию гистона гамма-H2AX после РО. Наши результаты свидетельствуют о том, что введение экзогенного

НАД влияет на уровень фосфорилирования—дефосфорилирования гистона H2AX после PO.

ТЕЛЬЦА КАХАЛА В ЯДРАХ ООЦИТОВ ГОЛУБЯ СИЗОГО *COLUMBIA LIVIA* С ИНАКТИВИРОВАННЫМ ЯДРЫШКОВЫМ ОРГАНИЗАТОРОМ. © Т. Ходюченко, А. В. Красикова, Е. Р. Гагинская. Кафедра цитологии и гистологии С.-Петербургского государственного университета, spbchromas@gmail.com.

Тельца Кахала (ТК) — эволюционно консервативные внутриядерные органеллы, которые имеют модульную организацию, определяющую специфические особенности их функционирования в разных внутриядерных процессах. Известно, что в ТК осуществляются завершающие этапы созревания и сборки малых ядерных (мя) и малых ядрышковых (мяш) РНК, но полностью функции и молекулярный состав этих органелл до сих пор неясны. Исследование существующих в природе вариаций структурно-функциональной организации ядра дает уникальную возможность углубить наши представления о функциях, выполняемых ТК. Благодаря большим размерам и особенностям организации, в частности отсутствию ядрышек, ядра растущих ооцитов (зародышевые пузырьки — ЗП) половозрелых самок птиц представляют собой удобную модель для такого рода исследования. В ЗП птиц, содержащих транскрипционно активные хромосомы в форме ламповых щеток, ТК до настоящего времени не были обнаружены. Однако в ядрах ооцитов домашнего голубя *Columba livia* охарактеризованы два типа экстрахромосомных сферических телец, природа которых неизвестна и которые на основании данных электронной микроскопии были названы «полыми сферами» (ПС) и «плотными шарами» (ПШ). В настоящей работе мы исследовали морфологию, молекулярный состав и возможные функции этих необычных внутриядерных телец, а также впервые описали 3D-архитектуру ядер ооцитов голубя. Окрашивание изолированных ЗП флуоресцентным красителем Sytox green, высокоспецифичным к нуклеиновым кислотам, и антителами против ДНК показало, что и ПС, и ПШ содержат РНК, но не ДНК. С помощью лазерной конфокальной сканирующей микроскопии мы показали, что число РНК-содержащих сфер в ЗП голубя варьирует от одной до нескольких десятков. Их положение в пространстве ядра нерегулярное, в более крупных ооцитах ПС и ПШ часто группируются у одного из полюсов ядра. Плотный матрикс ПС и ПШ не содержит гранул, а имеет фибриллярное строение. В настоящей работе обнаружено, что среди внутриядерных структур ооцита только ПС и ПШ содержат белок р80-коилин (один из основных молекулярных маркеров ТК у большинства организмов, включая птиц). При дальнейшем анализе молекулярного состава внутриядерных структур ЗП голубя выявлено, что исследуемые экстрахромосомные сферы также накапливают зрелые мяРНК и основные белки мяРНК. Однако ни ПС, ни ПШ не содержат фактора сплайсинга SC35, который в свою очередь активно аккумулируется в РНК-матрикс латеральных петель хромосом. Таким образом, ПС и ПШ обнаруживают признаки, типичные для ТК. Однако ТК, выявленные в ЗП голубя, не содержат белков ядрышек, таких как Nopp140, N038 и фибрилларин, характерных для экстрахромосомных ТК в ооцитах амфибий. При этом особенности состава ТК в ооцитах голубя отчетливо коррелируют с особенностями оогенеза птиц, а именно инак-

тивацией ядрышкового организатора, и как следствие — с отсутствием в ЗП функционирующих ядрышек. Результаты нашего исследования дают основание предполагать, что ПС и ПШ в ооцитах голубя причастны к биогенезу мяРНК, но не мяшРНК, и убедительно подтверждают представления о модульной организации ТК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-01328а), гранта президента РФ МК-1677.2009.4 и при технической поддержке ЦКП «ХРОМАС» С.-Петербургского государственного университета.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ В ЯДРАХ АНТИПОД *HORDEUM VULGARE* L. © Е. А. Хрусталева, Т. В. Ананьина, В. Н. Стегний. Томский государственный университет, center_cu@res.tsu.ru.

Политенные хромосомы обнаружены в разных клетках, тканях и органах растений — антиподах, синергидах, эндосперме, тапетуме, гаустории, интегументе и железистых волосках. Данные ткани относятся к короткоживущим и активно функционирующим образованиям.

Исследования политении в клетках антиподального комплекса (АК) представляют интерес с той точки зрения, что АК является физиологически активной тканью, предположительно участвует в обеспечении необходимыми веществами эндосперма в процессе макроспорогенеза и на ранних этапах органогенеза (Чабан, 2008). Особенность политении хромосом антипод злаков состоит в том, что антиподы исходно гаплоидны и хромосомы не имеют дисковой структуры (Петрова и др., 1985).

Объектом исследования служил ячмень *Hordeum vulgare* L. сорта Соболек урожая 2008 г., $2n = 14$. Анализировали клетки АК в семяпочках размером 0.3—1.5 мм. Клетки окрашивали DAPI. Анализ объемных препаратов проводили с помощью флуоресцентного микроскопа AxioImager.Z1 (Zeiss), для реконструкции трехмерных изображений ядер антипод использовали программу Axiovisin Rel. 4.7.

В зародышевых мешках (ЗМ) разного размера и в одном ЗМ соседние клетки АК находятся на разной стадии формирования политенных хромосом. Выделено шесть стадий политении, различающихся по морфологии политенных хромосом и их локализации в ядре. Стадии I и II обнаружены в семяпочках размером 0.3 мм, стадия III — 0.5 мм, IV и V — 1 мм, VI — 1.5 мм. Стадия I характеризуется пристеночным положением хроматина. На стадии II начинается конденсация хроматина, хромосомы контактируют друг с другом, наблюдаются выпетливания нитей хроматина. На стадии III политенные хромосомы представлены семью наиболее компактными, хорошо оформленными и отдельно лежащими структурами.

Антиподы демонстрируют интенсивную метаболическую активность, но кратковременно. На 3-й день после цветения и произошедшего оплодотворения начинается лизис антипод (Ивановская, 1983). Хромосомы сближаются и концентрируются на одном полюсе ядра (стадия IV), после чего хромосомы как бы оплаваются, отдельные хромосомы уже не выявляются, хроматин занимает пристеночное положение (стадия V). Следует

отметить, что на первых пяти стадиях центр ядра занимает 1—2 ядрышка округлой формы, хроматин локализуется преимущественно только в одной половине объема ядра, на противоположной половине находятся мелкие блоки хроматина, число которых варьирует. Последняя стадия, VI, характеризуется структурными изменениями хроматина, проявляющимися в его фрагментации и хаотичном расположении в пространстве деформирующегося ядра, при этом ядрышко не визуализируется. В клетках АК на данной стадии увеличиваются число и размеры вакуолей.

Исследования проводились при финансовой поддержке ФЦП № П-801.

ВНУТРИКЛЕТОЧНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕРНАЛИЗОВАННЫХ КЛЕТКАМИ ПРОТЕАСОМ. © А. С. Циμοха, Ю. Я. Зайкова, Б. М. Кравец, В. А. Куличкова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Осуществляя строго контролируемый протеолиз и процессинг регуляторных белков, 26S-протеасомы играют ключевую роль во всех основных клеточных процессах: дифференцировке, апоптозе, проведении сигнала, иммунном ответе, продвижении клетки по фазам клеточного цикла. Согласно современным представлениям, протеасомы являются одним из главных компонентов новой регуляторной клеточной системы.

Ранее было обнаружено, что эукариотические клетки способны выделять как в культуральную среду, так и в межклеточное пространство протеасомы. Кроме того, было выявлено увеличение количества экспортируемых из клеток протеасом у онкологических больных, что позволяло рассматривать эти частицы как опухолевые маркеры.

В представленной работе впервые показано, что экзогенные протеасомы способны быстро проникать из культуральной среды в живые клетки. Так, уже через 15 мин инкубации клеток K562 с мечеными протеасомами метка обнаруживается как в цитоплазме, так и в ядрах клеток, что говорит о быстром поступлении частиц внутрь клеток. Представляет интерес тот факт, что хотя общее содержание меченых частиц в клетках заметно увеличилось при увеличении времени инкубации, сама картина распределения меченых протеасом в клетках-реципиентах после 15 мин, 1 и 24 ч инкубации с протеасомами принципиальным образом не менялась.

Протеасомы, несущие флуоресцентную метку, локализируются в гранулах, равномерно распределенных по цитоплазме и ядру, а также в ярких крупных скоплениях, пока не идентифицированных. Таким образом, эксперименты с мечеными частицами показали, что 26S-протеасомы способны быстро проникать из культуральной среды в клетки K562 и выявляются как в цитоплазме, так и в ядрах клеток-реципиентов в течение длительного времени.

Локализация эндогенных протеасом в клетках тканеспецифична и, кроме того, зависит от фазы клеточного цикла и функционального состояния клеток. Протеасомы обнаруживаются в ядрах и цитоплазме, а также выявляются в ассоциации с различными внутриклеточными органеллами, в частности с элементами цитоскелета, центросомой и эндоплазматическим ретикуломом. Конкретную природу структур, в которых наблюдаются интерна-

лизованные клетками протеасомы, еще предстоит исследовать.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 08-04-00834 и 10-04-01234), в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 гг. (ГК № 02.740.11.0094 и П1389), гранта программы президенту РАН по молекулярной и клеточной биологии и с использованием оборудования ЦКП «Материаловедение и диагностика в передовых технологиях».

РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЕ ПОДАВЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ПЕРЕКРЫВАЮЩИХСЯ ТРАНСКРИПТОВ ГЕНОВОГО КОМПЛЕКСА *lawc/Trf2* У *DROSOPHYLA MELANOGASTER*. © П. О. Черезов, Ю. Е. Воронцова, О. Б. Сиимонова. Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва.

К настоящему моменту известно, что многие гены высших эукариот перекрываются. Большинство исследований по таким генам проводится на основе крупномасштабных анализов баз данных. Однако экспериментальных подтверждений влияния перекрытия генов на их функционирование очень мало. Чаще всего такие работы носят предположительный характер.

Ранее в нашей лаборатории был открыт ген *leg-arista-wing complex (lawc)* у *Drosophila melanogaster*. Мы показали, что его 5'-область пересекается со вторым экзоном гена, кодирующего гомолог фактора транскрипции человека TATA box binding protein-related factor 2 (TRF2), участвующего в регуляции морфогенеза. Таким образом, систему этих генов удобно использовать в качестве модели для исследования особенностей работы перекрывающихся генов, контролирующих развитие.

Сначала мы охарактеризовали размер и количество транскриптов, принадлежащих каждому гену. Нозерн-блот-анализ мРНК взрослых *D. melanogaster* дикого типа показал, что перекрывающаяся зона двух генов входит в состав 9 транскриптов, 2 из которых принадлежат гену *lawc*, а остальные — *Trf2*. Таким образом, впервые установлена реальная картина экспрессии разнонаправленных транскриптов комплекса *lawc/Trf2*.

В целях исследования взаимодействия прямых и обратных транскриптов мы получили конструкцию 3'-*lawc-RNAi (Ri)* для инактивации экспрессии всех *lawc*-транскриптов. Далее были получены трансгенные по этой конструкции линии дрозофил, которые использовались в генетических экспериментах по ее активированию в дрожжевой двухкомпонентной системе UAS/GAL4. Активация конструкции *Ri* привела к резкому снижению жизнеспособности самцов. Исследование фенотипа погибших эмбрионов показало наличие у них ряда аномалий, характерных для эмбрионов со сниженной экспрессией TRF2. Введение дополнительных конструкций, экспрессирующих TRF2, восстанавливало жизнеспособность мух, подтверждая тот факт, что эмбриональная гибель в трансгенных линиях является результатом снижения уровня экспрессии *Trf2*. ПЦР в реальном времени показала, что у мух, несущих активированную конструкцию *Ri*, экспрессия гена *lawc* увеличена в 3 раза, в то время как уровень экспрессии *Trf2* в 4 раза снижен. Очевидно, что такое поведение разнонаправленных перекрывающихся

транскриптов не случайно и, возможно, осуществляется по механизму РНК-интерференции.

СТРУКТУРА ХРОМАТИНА РЕГУЛЯТОРНОЙ ОБЛАСТИ ГОРМОН-ЗАВИСИМОГО ГЕНА ТРИПТОФАНДИОКСИГЕНАЗЫ ПРИ ТРАНСКРИПЦИИ IN VITRO.
© Г. И. Чихиржина, Е. В. Романовская. Кафедра биохимии С.-Петербургского государственного университета.

Регуляция транскрипции генов у эукариот характеризуется рядом особенностей, связанных с необходимостью поддержания координированной экспрессии генов в сложноорганизованной генетической системе. Решающее значение в контроле транскрипции генов эукариот имеют изменения структуры хроматина. При структурных преобразованиях хроматина осуществляется репрессия и депрессия генов во время дифференцировки клеток, поддерживается соответствующее функциональное состояние отдельных генов, их больших массивов и целых хромосом на протяжении всей жизни организма.

Особый интерес представляет изучение структуры хроматина регуляторных областей активируемых генов; однако, несмотря на интенсивные исследования, данные о тонких изменениях структуры хроматина недостаточны и противоречивы. Одной из наиболее полно охарактеризованных моделей структурных переходов хроматина регуляторных областей гормонзависимых генов, потенциально способных к будущей экспрессии, является хроматин длинного концевой повтора ретровируса опухоли молочной железы мыши (MMTV LTR). По одним данным, ремоделирование хроматина вирусного промотора происходит только после присоединения рецептора стероидных гормонов; в другом случае хроматин конститутивно находится в открытой конформации. Наряду с этим существуют данные о сохранении нуклеосом регуляторных областей в реорганизованном виде при активации глюкокортикоидзависимых генов. Возможно, противоречивость данных связана с адекватностью модельных систем для изучения ремоделирования хроматина регуляторных областей гормонзависимых генов при их активации и возможном несоответствии молекулярных механизмов структурных переходов хроматина в модельных системах и в живом организме.

В качестве модельной системы нами был выбран тканеспецифичный глюкокортикоидзависимый ген триптофандиоксигеназы (*tdo*) крысы, в хроматине регуляторной области которого ранее были идентифицированы два гиперчувствительных к ДНКазе I участка. Нами показано, что при фрагментации этой области гена микрококковой нуклеазой наблюдаются нарушение периодичности разрывов ДНК и накопление фрагмента ДНК с большей, чем нуклеосомная, электрофоретической подвижностью. В контрольных опытах по реконструкции нуклеосомных коровых частиц *in vitro* показано, что ДНК этой области вовлекается в образование классических коровых частиц. На основании полученных данных можно сделать вывод о разрушении канонических нуклеосом в регуляторной области в состоянии активной транскрипции *in vivo*. Вероятно, эти изменения в структуре хроматина отражают состояние компетенции гена к транскрипции и транскрипционно активное состояние гена.

В предыдущих исследованиях нами было показано связывание *in vitro* с регуляторной областью гена *tdo* транскрипционных факторов семейства NF1, который, по

данным литературы, обеспечивает формирование и поддержание открытой структуры хроматина регуляторной области гена лизоцима. Принимая во внимание наши данные о ремоделировании хроматина регуляторной области гена *tdo* при транскрипции *in vivo*, мы высказали предположение об участии фактора семейства NF1 в поддержании открытой структуры хроматина регуляторной области гена *tdo*. В настоящее время нами проводится изучение распределения *tdo* транскрипционных факторов семейства NF1 в регуляторной области гена в модельной системе и в тканях с активной и неактивной транскрипцией гена *tdo* методом иммунопреципитации хроматина.

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ КОМПЛЕКСОВ ДНК С БЕЛКОМ NMGB1 В ПРИСУТСТВИИ ЛИНКЕРНОГО ГИСТОНА H1. © Е. В. Чихиржина,¹ А. М. Поляничко,^{1,2} Е. И. Костылева,¹ Т. Родионова,² И. Кипенко,^{1,2} В. И. Воробьев.¹ ¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и ²С.-Петербургский государственный университет.

Функционирование и хранение генетического материала в клеточном ядре тесно связаны со структурной организацией хроматина, которую обеспечивают в том числе и различные «архитектурные» факторы. Среди таких факторов особый интерес представляют белки, связанные с линкерным участком ДНК: гистон H1 и негистоновый хромосомный белок NMGB1. Белок NMGB1 относится к группе белков с высокой электрофоретической подвижностью (High Mobility Group). NMGB1 — один из самых распространенных негистоновых белков хроматина. Большой интерес представляют структурно-консервативные ДНК-связывающие домены этого белка, которые обнаружены во многих транскрипционных факторах. Следует отметить, что связывание таких белков с ДНК происходит посредством NMGB-доменов. Линкерный гистон H1 отвечает за поддержание структур высшего порядка хроматина. Однако вопрос о взаимоотношениях между этими белками до сих пор не выяснен, хотя не вызывает сомнений, что структурные аспекты взаимодействия NMGB1 и H1 с ДНК существенны для понимания как функций NMGB1 в хроматине, так и структуры многокомпонентных функциональных ДНК-белковых комплексов. Некоторые авторы предполагают возможную конкуренцию между H1 и NMGB1 за связывание с отдельными участками ДНК. Предполагается, что, конкурируя с H1 за связывание с локальными областями хроматина, NMGB1 может влиять на их функциональную активность. По мнению других и по данным, полученным нами ранее, эти белки, скорее, выполняют общую функцию.

В данной работе методами спектроскопии поглощения и кругового дихоизма (КД) в ультрафиолетовом (УФ) и инфракрасном (ИК) диапазонах были исследованы комплексы ДНК с белками хроматина H1 и NMGB1 в условиях различных ионных сил и при различном содержании белков в комплексе. Основываясь на результатах анализа УФ- и ИК-спектров КД комплексов ДНК с гистоном H1 и негистоновым белком NMGB1, были сделаны следующие основные заключения. В растворах 15 мМ NaCl при весовых соотношениях белок/ДНК $r < 1$ ни один из белков не проявляет АТ- или ГЦ-избирательности в связывании с ДНК. В присутствии обоих белков доминируют взаимодействия в малой бороздке ДНК, вызванные связыванием с NMGB1. Гистон H1 предпочтительно взаимодействует с отрицательно заряженными группами ДНК (фосфаты) и

белка HMGB1 (С-концевая последовательность, состоящая из остатков аспарагиновой и глутаминовой аминокислот). Тем самым молекулы гистона экранируют отрицательный заряд этих групп, облегчая взаимодействие HMGB1 с ДНК. Совместное связывание HMGB1 и H1 стимулирует сборку надмолекулярных ДНК-белковых структур. Было показано, что структурная организация тройных комплексов зависит не только от характера ДНК-белковых взаимодействий, но и в существенной степени от взаимодействий между HMGB1 и H1. Использование метода атомной силовой микроскопии для анализа комплексов ДНК—H1—HMGB1 позволило нам наблюдать образование сложных ДНК-белковых фибрилл.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 09-08-01119 и 10-04-00092) и правительства Санкт-Петербурга.

ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРЫ ДНК-БЕЛКОВОГО КОМПЛЕКСА, ИНДУЦИРОВАННЫЕ ЦИС- И ТРАНСИЗОМЕРАМИ ДИХЛОРИДИАМИНОПЛАТИНЫ(II). © *Е. В. Чухиржина,¹ А. М. Поляничко,^{1,2} М. Феофилова,² В. И. Воробьев.¹* ¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и ²С.-Петербургский государственный университет.

Сегодня в клинической практике в качестве противоопухолевого препарата широко применяется дихлордиаминоплатина(II) (цис-ДДП, цисплатин). Транс-ДДП отличается от цисплатина только расположением ионов хлора. До сих пор непонятно, почему этот изомер не проявляет терапевтического действия. Оба изомера платины II, взаимодействуя с ДНК, образуют стабильные платиновые аддукты. При этом происходят изменения структуры двойной спирали. Однако цисизомер вызывает подавление развития злокачественных образований, а трансизомер нет. ДНК находится в ядре в виде сложного ДНК-белкового комплекса, и, вероятно, противоопухолевая активность препаратов платины определяется взаимодействием не только с ДНК, но и с белками хроматина. Некоторые ядерные белки способны узнавать участки с различными структурными нарушениями двойной спирали. Среди них самыми распространенными являются линкерный гистон H1 и негистоновые хромосомные белки HMGB1 и HMGB2, которые взаимодействуют с линкерной ДНК. Гистон H1 расположен по большой бороздке ДНК, в то время как HMGB1 и 2 связываются с ДНК по малой бороздке. Многие авторы рассматривают эти белки как «архитектурные» факторы транскрипции, поскольку они вовлечены в образование сложных функциональнозначимых ДНК-белковых комплексов. Интерес к белку HMGB1 определяется еще и тем, что во многих регуляторных белках обнаружен ДНК-связывающий мотив, гомологичный А-домену HMGB1 (так называемые HMGB-домены). Следует отметить, что такие регуляторные белки связаны с ДНК посредством именно HMGB-доменов. Линкерный гистон отвечает прежде всего за компактизацию нуклеосомной цепи в 30-нанометровую фибриллу.

В работе методами спектроскопии поглощения и кругового дихроизма в ультрафиолетовом диапазоне были исследованы комплексы ДНК, модифицированной цис- и транс-ДДП, с белками хроматина H1 и HMGB1 и 2 в условиях различных ионных сил и при различном содержании белков и ионов платины в комплексе. Анализ ки-

нетических кривых, полученных при исследовании процесса платинирования ДНК, показал различный механизм взаимодействия ДНК с цис- и трансизомерами платины. Ярко выраженных различий между взаимодействием гистона H1 с ДНК, модифицированной цисплатином, и ДНК, связанной с трансизомером, не наблюдается. В комплексах с трансизомером платины при малых соотношениях [Pt]/[2P] связывание HMGB1 с аддуктами на ДНК носит случайный характер, что проявляется в возможности связывания более чем одним способом. При высоком содержании трансизомера платины в комплексе изменения в структуре ДНК носят более выраженный характер, что свидетельствует о схожести механизмов взаимодействия HMGB1 с цис-ДДП/ДНК. По всей видимости, в данной системе существует единственный способ связывания, а взаимодействия происходят за счет HMGB-домена.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 09-08-01119 и 10-04-00092), правительства Санкт-Петербурга и программы «Ведущие научные школы».

ВЛИЯНИЕ ПОНИЖЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ НА БИОСИНТЕТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ РАЗВИВАЮЩИХСЯ ООЦИТОВ МОЗАМБИКСКОЙ ТИЛЯПИИ. © *Д. А. Чмилевский.* Биолого-почвенный факультет С.-Петербургского государственного университета, ichtyol1943@mail.ru.

Температура является важнейшим контролирующим фактором окружающей среды. Особенно существенно ее влияние на пойкилотермных животных, какими и являются рыбы. Исследования по влиянию температурного воздействия на гаметогенез рыб традиционно проводятся на кафедре ихтиологии и гидробиологии С.-Петербургского (Ленинградского) государственного университета (Гербильский, 1939; Казанский, 1976; Чмилевский, 1994, 1995, 1996, 1998).

Цель настоящего исследования — изучить влияние пониженной температуры на морфофункциональное состояние развивающихся ооцитов мозамбикской тилляпии.

Гонады самок тилляпии фиксировали для световой и электронной микроскопии в фиксаторах Буэна и Карнуа и глутаральдегиде с последующим осмированием. Опыты с ³H-уридином и ³H-лейцином проводились по сходной схеме. В течение 5 сут подопытных рыб содержали при пониженной температуре (19—22 °С), затем вводили меченый предшественник. Далее рыб еще 5 сут выращивали в условиях с пониженной температурой. Общая продолжительность опыта составляла 10 сут. Контрольных рыб постоянно содержали при 25—28 °С. Через временные интервалы в 8 ч, 1, 2 и 5 сут гонады контрольных и подопытных рыб фиксировали в жидкости Карнуа. Изготовление автографов и их проявление проводили стандартным способом.

После воздействия пониженной температуры наблюдались характерные изменения морфологии ооцитов. В цитоплазме превителлогенных ооцитов отмечалось возникновение зон интенсивной окраски. На ультраструктурном уровне эти зоны представляют собой скопления митохондрий и рибосом, тесно примыкающих к ядерной оболочке. Как было показано ранее (Чмилевский, 2009), в цитоплазме превителлогенных ооцитов в результате замедленного выведения меченой РНК наблюдалась концентрация метки с внутренней и внешней сторон ядерной оболочки. Параллельно отмечалось снижение уровня биосин-

теза белка. Вителлогенные ооциты реагировали на воздействие пониженной температуры увеличением объема ядрышек. Это, очевидно, связано с замедлением выведения меченой РНК из ядрышек (Чмилевский, 2009). Интенсивность включения ^3H -лейцина в цитоплазму вителлогенных ооцитов была сходной с таковой у контрольных рыб.

Несомненно, что отмеченная реакция цитоплазмы превителлогенных ооцитов имеет защитное значение. У близкого и более холодолюбивого вида — нильской тилпии — для возникновения этих зон характерны более низкие пороговые температуры. На основании собственных и литературных данных установлены пороговые температуры возникновения таких зон для представителей осетровых, лососевых, сиговых, карповых и цихлидовых рыб. Сделано заключение о том, что температуры, при которых возникают такие зоны, видоспецифичны и их можно использовать как один из показателей теплоустойчивости вида.

УЧАСТКИ ПРИКРЕПЛЕНИЯ ХРОСОМОМ К ЯДЕРНОЙ ОБОЛОЧКЕ ВЫПОЛНЯЮТ ФУНКЦИЮ ГРАНИЦ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ДОМЕНОВ. © А. Н. Шабарина, М. В. Глазков. Институт биологии развития им. Н. К. Колцова РАН, Москва.

В настоящее время накоплен большой фактический материал, касающийся структурной и функциональной организации хромосом в ядре. Предполагается, что пространственная организация хромосом (отдельных участков хромосом) в ядре является еще одним уровнем регуляции функционирования генома. Важная роль в этом отводится ядерной оболочке.

Ранее в нашей лаборатории мы выделили несколько последовательностей ДНК из ядерных оболочек гепатозитов мыши (яоДНК) и провели их компьютерный анализ. Один из фрагментов (*EnvM4*) имеет в своем составе участок, обладающий очень высокой гомологией (до 100 %) с геномами различных организмов — бактерий, растений, животных и человека. Другой важной особенностью этой последовательности является наличие в ее составе сайтов узнавания для белковых факторов позвоночных (среди них ТАТА-факторы, гомеодоменные белки, супрессор опухоли *p53* и др.). Сравнение нуклеотидной последовательности этого фрагмента с нуклеотидными последовательностями известных пограничных элементов позволяет предполагать, что фрагмент *EnvM4* может выполнять функцию границы функциональных единиц эукариотических хромосом.

Для экспериментальной проверки этого предположения мы использовали метод *P*-опосредованной трансформации эмбрионов *Drosophila melanogaster*. В линию с инактивированными генами *yellow* и *white* вводили конструкцию, в которой эти гены и их регуляторные элементы фланкированы фрагментами *EnvM4*. В результате было получено 10 линий трансгенных мух, у которых наблюдается интенсивная окраска глаз и кутикулярных структур, что свидетельствует о высоком уровне экспрессии генов *yellow* и *miniwhite*. Таким образом, показано, что фрагмент яоДНК способен защищать трансген от эффекта положения. С использованием метода рекомбинации *in vivo* показано, что сама изучаемая последовательность (*EnvM4*) не обладает регуляторной функцией в транскрипции.

На основании полученных результатов можно заключить, что фрагмент яоДНК способствует поддержа-

нию высокого уровня экспрессии трансгена независимо от места его интеграции в «хозяйские» хромосомы. Мы предполагаем, что яоДНК способствуют образованию независимого транскрипционного домена трансгенов, на который не влияет или слабо влияет хроматиновое окружение в месте встраивания в хромосому, а последовательности яоДНК являются претендентами на роль границ функциональных единиц эукариотических хромосом.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований президиума РАН «Биологическое разнообразие», подпрограммы «Генофонды и генетическое разнообразие».

НОВЫЕ БЕЛКОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В СОЗРЕВАНИИ И ТРАНСПОРТЕ мРНК ЧЕЛОВЕКА: КООПЕРАЦИЯ КОМПОНЕНТОВ АППАРАТОВ ТРАНСКРИПЦИИ И ТРАНСЛЯЦИИ. © Г. В. Шпаковский, Е. К. Шематорова, С. А. Прошкин, Г. М. Прошкина, Д. Г. Шпаковский. Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, gvs@ibch.ru.

Для высших эукариот характерна развитая система временной и пространственной регуляции активности генов. Все стадии генной экспрессии начиная от активации отдельных генов и их транскрипции, последующих этапов сплайсинга и процессинга гетерогенных ядерных пре-мРНК, формирования и контроля качества полноразмерных мРНК вплоть до экспорта уже зрелых мРНК из ядра в цитоплазму очень тесно переплетаются и сопряжены между собой. При транспортировке из ядра в цитоплазму (к местам синтеза белка) созревающие мРНК упаковываются в разнообразные рубонуклеопротеидные комплексы, различающиеся для разных наборов мРНК (Culjkovic B. et al., J. Cell Biol., 2006, 175 : 415—426). Наконец, для уничтожения неправильных вариантов и мутантных форм мРНК существует специальный механизм (NMD: nonsense-mediated mRNA decay), индуцирующий деградацию aberrантных мРНК.

Мы изучили молекулярную эволюцию специфических для человека изоформ субъединицы РНК-полимеразы II hRPB11 (POLR2J) (Шематорова и др., 2010) и с помощью генетических (дрожжевая двухгибридная система) и биохимических (соосаждение белков из клеточных лизатов) подходов охарактеризовали компоненты протеома *Homo sapiens*, взаимодействующие с двумя минорными изоформами — hRPB11b α (b3) и hRPB11c α (c3) — продуктами экспрессии соответственно генов *POLR2J2* и *POLR2J3* (Шпаковский и др., 2004). Помимо нескольких субъединиц ядерных РНК-полимераз (hRPB3, hRPB6, hRPC40), а также общих и специализированных факторов транскрипции (BTF3, ATF4 и ART-27) среди обнаруженных белков-партнеров оказались компоненты других рубонуклеопротеидных комплексов, вовлеченных в более поздние этапы биогенеза мРНК в ядре: компоненты сплайсеосомы SnRNP25 и PRP3, ряд белков с цинк-фингерными РНК-связывающими доменами, а также особая (укороченная) изоформа субъединицы фактора инициации трансляции EIF3 (347 а.о.) — pcEIF3m (242 а.о.), имеющая преимущественно ядерную локализацию. Установлено, что минорные субъединицы hRPB11b α и hRPB11c α в отличие от основной субъединицы РНК-полимеразы II человека hRPB11a взаимодействуют *in vivo* и

in vitro также с двумя другими компонентами этого фактора инициации трансляции — субъединицами eIF3a и eIF3i, некоторое количество которых также обнаруживается в ядре клеток. В совокупности с недавно опубликованными данными об обнаружении и hRPB11, и ряда субъединиц EIF3 в составе ансамбля белков, важного для правильной терминации транскрипции и 3'-процессинга пре-мРНК (Shi Y. et al., Mol. Cell, 2009, 33 : 365—376), наши результаты свидетельствуют о существовании особьх, ядерных субкомплексов фактора инициации трансляции EIF3, участвующих в созревании и транспорте определенного набора мРНК человека.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы РАН «Молекулярная и клеточная биология» (направление «Функциональная геномика») и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-01100).

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ ХРОМАТИНА НА ПРОМОТОРАХ ГЕНОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА РЕГУЛИРУЕТСЯ ХРОМАТИНРЕМОДЕЛИРУЮЩИМИ ЭНЗИМАТИЧЕСКИМИ АКТИВНОСТЯМИ. © Т. Ю. Еркина,^{1,2} Ю. Зоу,² В. И. Воробьев,³ А. М. Еркин.^{1,2} ¹Фармацевтический колледж Университета Батлера, Индианаполис, США, ²Отдел биомедицинских исследований Университета Южной Дакоты, Вермилион, США и ³Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, terkina@butler.edu.

Ответ на стресс в дрожжевых клетках регулируется по крайней мере двумя классами транскрипционных активаторов — HSF и Msn2/4, которые по-разному влияют на ремоделирование хроматина. Мы показываем, что делетирование SNF2 — АТФазной субъединицы комплекса SWI/SNF полностью элиминирует удаление гистонов, связывание РНК-полимеразы и HSF с промотором *HSP12*, а также замедляет эти процессы на промоторах *HSP82* и *SSA4*. Делетирование *MSN2* и *MSN4* лиминирует связывание РНК-полимеразы и ремоделирование хроматина только на промоторе *HSP12*, но не на промоторах *HSP82* и *SSA4*, что может свидетельствовать о том, что активаторы Msn2/4 являются доминантными регуляторами на промоторе *HSP12*. Во время теплового шока на промоторе *HSP12* количество Msn2/4 падает ниже базального. Это, возможно, является результатом направленной деградции Msn2/4, связанной со сборкой транскрипционного комплекса. Если кинетические профили удаления гистонов носят промотор-специфический характер, то возврат нуклеосом на изучаемые промоторы после окончания действия теплового шока протекает с приблизительно одинаковой скоростью для всех изученных генов. Мы также показываем, что делетирование STN1 — аналога SNF2 — в комплексе RSC значительно уменьшает удаление гистонов и связывание РНК-полимеразы на всех трех промоторах. Этот результат позволяет заключить, что взаимозаменяемость между комплексами SWI/SNF и RSC носит ограниченный характер и, вероятно, затрагивает различные хроматинре моделирующие этапы на изучаемых нами промоторах. В то время как инактивация других АТФ-зависимых комплексов оказывает незначительное влияние на ремоделирование хроматина на промоторах *HSP12*, *HSP82* и *SSA4*, одновременная инактивация ISW1 и SNF2 оказывает синергетический эффект, выражающийся в сильном снижении скорости удаления

нуклеосом и элиминировании связывания РНК-полимеразы на всех трех промоторах. Кроме этого прекращается связывание HSF с промоторами *HSP82* и *SSA4* до теплового шока и значительно уменьшается связывание HSF во время теплового шока. Полученные данные показывают, что предварительное образование хроматинре моделирующего комплекса необходимо для связывания активатора.

ВЫЯВЛЕНИЕ ДОМЕНОВ АКТИНСВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА АЛЬФА-АКТИНИНА-4 (ACTN4), ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА ЕГО ЛОКАЛИЗАЦИЮ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ В ЯДРЕ. © В. Ю. Аксенова,^{1,2} М. Г. Хотин,² Л. В. Туроверова,² Г. П. Пинаев,² Д. Г. Тентлер.² ¹С.-Петербургский государственный университет и ²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, vasilina_spb@mail.ru.

Согласно современным моделям, актиновый цитоскелет в основном выполняет функции клеточного каркаса, а также принимает участие в пролиферации, миграции клеток и адгезии клеток к субстрату. В последние годы появляются данные об участии белков цитоскелета в не канонических для них функциях, таких как регуляция экспрессии генов (активация транскрипции, взаимодействие с РНК-полимеразами и транскрипционными факторами), ремоделирование хроматина и участие в сплайсинге пре-мРНК. Одним из таких цитоскелетных белков, для которого были показаны участие в ядерных процессах и ядерная локализация, является альфа-актинин-4 (ACTN4). При определенных условиях он изменяет свою основную цитоплазматическую локализацию и мигрирует в ядро и, возможно, принимает непосредственное участие в регуляции транскрипции и сплайсинге пре-мРНК. Полагают, что изменение внутриклеточной локализации (ACTN4) ассоциировано с нарушением его взаимодействия с фибриллярным актином. В соответствии с этим предположением для выявления участков (ACTN4), которые могут быть вовлечены в ядерные функции белка и отвечать за его транслокацию в ядро, мы решили провести делеционное картирование гена ACTN4. При клонировании кДНК (ACTN4) была выявлена новая, ранее не идентифицированная сплайсинговая изоформа ACTN4, специфичная для культуры клеток A431, не содержащая доменов связывания белка с F-актином, соответствующим двум кальпониновым доменам белка (CH₁—CH₂). В экспериментах по трансфекции культуры клеток НЕК293 методом иммунофлуоресценции было выявлено, что новая идентифицированная изоформа (ACTN4) не связана с цитоскелетом и имеет околядерную локализацию. Характер распределения данной изоформы отличался от распределения полноразмерного варианта белка, который в основном имел цитоплазматическую локализацию. Проведенные исследования показали, что данная укороченная сплайсинговая изоформа может иметь другие не связанные с цитоскелетом функции в отличие от полноразмерного варианта белка, участвующего в основном в стабилизации и реорганизации цитоскелета.

Для дальнейших исследований также были сконструированы экспрессионные плазмиды с делециями последнего Ca²⁺-связывающего домена (EF₂), с делецией домена CH₁—CH₂ и EF₂ одновременно, с делецией первых 30 N-концевых аминокислотных остатков, содержащих участок, обогащенный аминокислотой глицин, плазмиды, содержащие делеции двух спектриновых доменов, а также

плазида, кодирующая полноразмерный вариант белка. В ходе экспериментальной работы планируется определить внутриклеточную локализацию данных делеционных вариантов, а также изолировать ядерные белковые комплексы, включающие в себя новую укороченную изоформу (ACTN4), и определить составляющие их компоненты.

Научно-исследовательская работа проведена в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 гг. по государственному контракту № П174.

Официальный спонсор симпозиума:

Technoinfo Limited

«Превосходная визуализация и интеллектуальный анализ»

121248 Москва, Кутузовский пр., д. 9, корп. 2а, оф. 77
Тел./факс: +7(499) 243 66 26; e-mail: sales@technoinfo.ru; www.technoinfo.ru

37 Warren Street London W1T1 6AD England,
Tel/Fax +44(208)361 03 74; e-mail: tinfoltd@aol.com