

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

(Санкт-Петербург, 28—30 октября 2014 г.)

ЦЕНТРОМЕРНЫЙ ИНДЕКС ДНК ХРОМОСОМ ЧЕЛОВЕКА. © Н. А. Агафонова, Г. А. Сакута, Ю. М. Розанов, Г. И. Штейн, Б. Н. Кудрявцев. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, bn_kudryavtsev@mail.ru

Известно, что при идентификации и классификации хромосом одним из основных параметров является центромерный индекс (ЦИ). В целом ЦИ хромосом характеризуется постоянством в кариотипе определенного вида. Возможные причины изменения ЦИ хромосом — это структурные малые и большие перестройки хромосом. Кроме того, причиной небольшой изменчивости ЦИ может быть вариабельность гетерохроматиновых районов хромосом. В клинических условиях при анализе повреждений хромосом метод определения содержания ДНК в хромосомах человека нередко используется наряду с другими методами исследования хромосом. Микрофотометрические методы исследования ДНК хромосом на препаратах являются более чувствительными, чем измерения длины хромосом. По нашим данным, микрофлуориметрический метод позволяет определять содержание ДНК в индивидуальных хромосомах с точностью до 4.5 ф.

Результаты показали, что измерения содержания ДНК хромосом не зависят от степени спирализации хромосом, а вариабельность по размерам хромосом выше вариабельности по содержанию ДНК. Кроме того, нередко определяли вариации ДНК там, где они не могли быть обнаружены с помощью дифференциального окрашивания. Практически ни одно исследование содержания ДНК в хромосомах человека при болезнях, связанных с хромосомными аберрациями, не обходится без сведений о содержании ДНК в хромосомах его нормального кариотипа. С помощью микрофлуориметрического метода нами было измерено содержание ДНК в хромосомах, их p- и q-плечах. Препараторы метафазных хромосом получили по стандартной методике из первичной культуры лимфоцитов периферической крови 3 внешне нормальных доноров. Для определения содержания ДНК в индивидуальных хромосомах сначала их идентифицировали, используя дифференциальное Q-окрашивание с помощью флуоресцентного красителя Hoechst 33258, а затем те же хромосомы после удаления красителя окрашивали по Фёльгену, используя в качестве реактива типа Шиффа этидиум бромид-SO₂. Микрофлуориметрию содержания ДНК в индивидуальных хромосомах человека проводили с помощью анализатора изображений. ЦИ ДНК хромосо-

мы определяли как отношение интегральной яркости длинного плеча хромосомы к интегральной яркости целой хромосомы. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы Excel. В результате проделанной работы были измерены средние значения ЦИ ДНК с ошибками, стандартные отклонения и коэффициенты вариации всех хромосом, включая хромосомы X и Y, кариотипа человека. Сравнительный анализ полученных результатов показал сходство наших данных с данными других авторов.

ГЕТЕРОХРОМАТИНОВЫЕ БЛОКИ В КЛЕТКАХ ГЕРМАРИЯ *CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE). © Т. В. Ананьина. Научно-исследовательский институт биологии и биофизики Томского государственного университета, tany_a@list.ru

Гетерохроматин играет важную роль в организации и поддержании трехмерной структуры интерфазного ядра (обеспечивает межхромосомные взаимодействия на основе эktopической конъюгации и реализует связь хромосом с оболочкой ядра). Наше исследование направлено на изучение пространственной организации гетерохроматиновых блоков в ядрах на ранних стадиях дифференцировки клеток. В качестве объекта исследования были использованы клетки из переднего отдела овариол *Calliphora erythrocephala* (Mg) — гермария. Эти клетки (цистоциты) образуются в результате деления цистобластов — клеток, производных от половых стволовых клеток яичников. Деление цистобlasta и производных от него клеток не заканчивается цитотомией, и в результате четырех митотических делений образуется группа (циста) из 16 связанных между собой цитоплазматическими мостиками клеток. В области цитоплазматических мостиков формируются кольцевые каналы.

Изучали 16-клеточные цисты из отделов гермария 2а, 2б и 3. Был проведен анализ геометрии соединений клеток в цистах и изучено распределение гетерохроматиновых блоков в ядрах цистоцитов *C. erythrocephala*. Для анализа соединения цистоцитов в цистах гермария кольцевые каналы были окрашены фаллоидином, коньюгирующимся с FITC, и получены графические реконструкции отдельных цист, позволяющие определить, в результате какого из четырех митозов произошла та или иная клетка. Для изучения количества и расположения гетерохромати-

новых блоков ядра окрашивали DAPI. При уменьшении интенсивности свечения флуорохрома (в программе AxioVision 4.7) в ядрах выявляются блоки более интенсивно окрашенного хроматина. Были получены серии оптических срезов, на основании которых проведена графическая реконструкция расположения блоков в пространстве ядра. При сравнении ядер цистоцитов отдельных цист оказалось, что имеет место различие в количестве, размерах и расположении гетерохроматиновых блоков между клетками одной цисты. Ядра, сформировавшиеся после четвертого митоза, могут значительно различаться по этим признакам между собой и отличаться от ядер, сформировавшихся в результате первого и второго митозов. В двух про-ооцитах из регионов 2а и 2б также отмечаются различия в количестве и расположении блоков. При смещении цисты в регион 3 хроматин одного из про-ооцитов начинает конденсироваться, в других клетках цисты гетерохроматиновых блоков становится больше (2–5 вместо 1–3 в цистах из регионов 2а и 2б) и они уменьшаются в размерах. Дальнейшее изучение динамики гетерохроматиновых блоков на ранних этапах дифференцировки клеток позволит получить данные о восстановлении пространственной организации ядра после деления клетки и ответить на вопрос о том, какие внутриядерные ассоциации гетерохроматиновых районов воспроизводятся после деления и являются стабильными.

НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ ГЕНА *dRNaseZ* ДРОЗОФИЛЫ. © О. В. Андреенков,¹ Е. И. Волкова,¹ С. А. Демаков,¹ Э. Б. Дубровский,² И. Ф. Жимулов.¹ ¹Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, volk@mcb.nsc.ru, и ²Университет Фордхэма (Fordham University), США.

Ген *RNaseZ(L)* дрозофилы (*dRNaseZ*) кодирует белок, осуществляющий процессинг тРНК. Он является членом семейства ELAC1/ELAC2, имеющим гомологи у всех живых организмов. Недавние исследования показали, что этот ген вовлечен в такие фундаментальные биологические процессы, как рост и пролиферация клеток, митохондриальный биогенез и регуляция генов. Ген человека *ELAC2*, который кодирует гомолог *dRNaseZL*, связан с митохондриальнозависимыми заболеваниями и повышенным риском рака простаты. Для выяснения роли *ELAC2* в патологиях человека актуален функциональный анализ *RNaseZL* на модели дрозофилы. Ген *dRNaseZ* дрозофилы был идентифицирован и клонирован группой американских исследователей под руководством проф. Дубровского (Dubrovsky et al., 2004). Авторы показали, что он необходим для процессинга 3'-концов как ядерной, так и митохондриальной тРНК (Xie et al., 2011). Предварительные данные указывают на то, что белок *dRNaseZ* может иметь несколько биологических функций, причем часть из них, по-видимому, не связана с его катализической активностью. В рамках совместного проекта с группой проф. Дубровского для дальнейшего изучения биологических функций белка *dRNaseZ* мы использовали наиболее эффективный и современный метод гомологичной рекомбинации — «геномную инженерию».

На первом этапе с помощью ПЦР на основе ВАС-клона CH322-103J20 мы синтезировали 3'- и 5'-геномные фрагменты, flankирующие ген *dRNaseZ*. Эти фрагменты были последовательно клонированы в вектор pGX-attP.

Путем Р-элемент-опосредованной трансформации конструкция была вставлена в третью хромосому генома дрозофилы и получена «донорная линия». Скрещивание мух «донорной» линии с мухами, несущими трансген FLP рекомбиназы под контролем теплового шока, индуцирует вырезание ДНК донорного вектора по FRT-сайтам. В результате гомологичной рекомбинации ген *dRNaseZ* замещается на фрагмент, содержащий репортер [white⁺], окруженный loxP-сайтами, спаянный с attP. Среди почти 15 000 проанализированных потомков было найдено 11 красноглазых мух. Для 4 полученных линий была проведена ПЦР с соответствующими геномными праймерами, и событие гомологичной рекомбинации было доказано. Далее с помощью Cre-рекомбиназы вырезали [white⁺] по loxP-сайтам в одной из отобранных линий. Таким образом, была получена «базовая» линия *ΔdRNaseZ [w]/CyO*, геномная ДНК которой была также проверена с помощью специфических праймеров и секвенирована. Как и следовало ожидать, делеция гена *dRNaseZ* и его замещение сайтом attP вызвали летальность гомозиготных потомков. Далее мы провели реинтеграцию полноразмерной последовательности гена *dRNaseZ* с помощью фC31-интегразы по сайтам attP/attB. Для этого нами была создана трансгенная конструкция на основе вектора pGE-attB-GMR, в которую были клонированы ген *dRNaseZ* и короткий участок, кодирующий V5-эпитоп, для последующей детекции распределения в клетке продукта этого гена с помощью антител. После трансформации этого вектора в базовую линию, содержащую источник специфической фC31-интегразы, произошло «спасение» мутации. Таким образом, мы получили базовую линию и полноразмерную конструкцию гена *dRNaseZ*, «спасающую» фенотип, что позволяет в дальнейшем направленно и эффективно модифицировать изучаемый ген в любой желаемый аллель.

АНАЛИЗ РЕПЛИКАЦИИ И СОДЕРЖАНИЯ ДНК В ЯДРАХ ГЕМОЦИТОВ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ *ANADARA BROUGHTONII* ИЗ ЕСТЕСТВЕННОЙ ПОПУЛЯЦИИ АМУРСКОГО ЗАЛИВА ЯПОНСКОГО МОРЯ. © А. А. Анисимова, В. Д. Ларионов. Школа естественных наук Дальневосточного федерального университета, Владивосток, anisan77@mail.ru

Акватория российской части Северной Пацифики является зоной активного промысла морских биоресурсов, эффективность которого связана с регулярным мониторингом состояния популяций коммерчески значимых видов с целью отслеживания различных патологий, в том числе геномных и пролиферативных аномалий. В настоящей работе произведен анализ включения бромдезоксиуридина (БДУ) и содержания ДНК в ядрах гемоцитов половозрелых двусторчатых моллюсков *Anadara broughtonii* из Амурского зал. — зоны повышенной антропогенной нагрузки, прилегающей к урбанизированным территориям г. Владивостока и его аграрно-промышленных пригородов.

Микроскопический анализ включения БДУ (импульсная метка) показал, что у всех исследованных особей часть гемоцитов находилась в состоянии синтеза ДНК. Среди меченых клеток встречались как гиалиноциты (молодые гемоциты, предположительно способные к пролиферации), так и гранулоциты (терминально дифференцированные гемоциты). При этом у 70 % животных мети-

лись только гранулоциты (от 1 до 3 %); в этом случае доля меченых клеток не превышала 3 % от всех гемоцитов, поскольку гранулоциты представляют собой доминирующий клеточный морфотип (~ 99 %) в данной клеточной популяции. У остальных особей БДУ также включали от 30 до 65 % гиалиноцитов, за счет чего доля меченых клеток в расчете на всю клеточную популяцию варьировала от 2.5 до 6.2 %. Количество меченых гемоцитов очень слабо коррелировало с общей концентрацией клеток в гемолимфе (коэффициент корреляции 0.17).

Методом проточной цитометрии в исследованной выборке для гиалиноцитов было обнаружено несколько вариантов ДНК-профилей: 1) симметричный 2с-пик с коэффициентом вариации < 8 % (соответствует стабильному состоянию генома), присутствует до 10 % гипер-2с-клеток (40 % особей); 2) симметричный 2с-пик с коэффициентом вариации > 8 % (соответствует повышенной вариабельности размера генома; 10 % особей); 3) 2с-пик, асимметричный за счет появления гиподипloidных клеток (10 % особей); 4) от 10 до 30 % клеток формируют дополнительные гипердипloidные пики, в основном на уровне значений массы ДНК 3с (40 % особей). Характер ДНК-профилей для гранулоцитов был достаточно стандартным у всех исследованных животных: подавляющее большинство клеток (от 98.5 до 99.8 %) формировали на гистограмме симметричный 2с-пик с коэффициентом вариации ~ 8 %, остальные клетки были гипердипloidными. С учетом того, что гранулоциты доминируют в клеточной популяции, общая доля гипердипloidных гемоцитов у всех исследованных животных оказывается низкой ($1.0 \pm 0.1\%$).

Для всей исследованной выборки корреляция между количеством меченых БДУ клеток и количеством гипердипloidных клеток оказалась отрицательной. Кроме того, большинство гипердипloidных клеток не достигало значений массы ДНК 4с. Таким образом, репликация ДНК в клетках гемолимфы вряд ли связана с их пролиферацией — эта стадия гемопоэза, скорее всего, происходит в локализованных очагах. Если циркулирующие гемоциты и вступают в S-фазу, то до G₂-периода и митоза доходят лишь единицы. Возможно, обнаруженная нами репликация осуществляется в рамках reparации повреждений ДНК или отражает развитие вирусных инфекций. Высокая встречаемость аномалий в распределении гиалиноцитов по содержанию ДНК может свидетельствовать о нестабильности генома анадар в Амурском зал. и не исключает анеуплоидии и полиплоидии. Регистрация нестандартных ДНК-профилей в различных тканях двусторчатых моллюсков обычно рассматривается в бионикации как показатель генотоксичности водной среды. Отсутствие этих же аномалий в гранулоцитах может быть результатом отсева мутантных клеток на более ранних стадиях дифференцировки.

РЕОРГАНИЗАЦИЯ СИСТЕМЫ КОНТАКТОВ Х-ХРОМОСОМЫ С ЯДЕРНОЙ ОБОЛОЧКОЙ В ТРОФОЦИТАХ ЯИЧНИКОВ У ТРЕХ ВИДОВ МАЛЯРИЙНЫХ КОМАРОВ. © Г. Н. Артемов, В. В. Широкова, В. Н. Стегний. Томский государственный университет, g-artemov@mail.ru

В трофоцитах яичников малярийных комаров *Anopheles* политенные хромосомы имеют мощные прикрепления к ядерной оболочке, которые можно обнаружить на

полудавленых препаратах. Близкие виды малярийных комаров комплекса *maculipennis* различаются по наличию или отсутствию прикрепления у отдельных хромосом, по локализации районов прикрепления на хромосоме и по морфологическим характеристикам этих районов (Стегний, 1979, 1993, 2006). Кроме того, обнаружены видоспецифичные особенности локализации наиболее протяженных районов взаимодействия хромосом трофоцитов к ядерной ламине с помощью иммуноокрашивания антителами к ламину B (Артемов и др., 2013). В данной работе было продемонстрировано, что у X-хромосомы *An. beklemishevi* четыре района прикрепления — A, B, C и D; у *An. atroparvus* — три района прикрепления — 2C, 3A и 3C; у X-хромосомы *An. messeae* три района прикрепления — 1C, 1D и 2B-C. Задачей настоящего исследования было определить, расположены ли районы взаимодействия с ядерной ламиной в гомеологичных районах X-хромосомы у разных видов.

Некоторые районы X-хромосом трофоцитов, которые связываются с ламином B, были микродиссектированы, и ДНК-пробы этих районов использованы для перекрестной межвидовой флуоресцентной гибридизации *in situ* с хромосомами видов *An. beklemishevi*, *An. atroparvus* и *An. messeae*.

Гомеологичные району A X-хромосомы *An. beklemishevi* районы X-хромосомы *An. messeae* (район 2B-C) и *An. atroparvus* (2C) сохраняют связь с ядерной ламиной. Общее происхождение этих районов подтверждается также FISH ДНК-пробы 2C *An. atroparvus* с X-хромосомой *An. messeae* — сигнал локализовался в районе 2B-C. Гомеологичные району B районы *An. messeae* и *An. atroparvus* не обнаруживают контактов с ядерной ламиной. Полученные результаты доказывают существование наряду с эволюционно консервативными районами взаимодействия хромосом с ядерной ламиной районов, которые приобрели или утратили способность взаимодействовать с ламиной в ходе эволюции.

FISH ДНК-пробы района 3C *An. atroparvus* показала существование двух гомеологичных районов у *An. messeae* (районы 1C и 3A). При этом район 1C *An. messeae* взаимодействует с ламином, а 3A не обнаруживает взаимодействия применяемыми нами методами. Попытка гибридизовать ДНК-пробу района 1C *An. messeae* с хромосомами *An. atroparvus* привела к сходному результату, когда у X-хромосомы этого вида обнаружились не один, а два гомеологичных района 3C и 1C. 3C имеет контакт с ламиной, а 1C — нет. Результаты двух последних FISH могут быть объяснены локализацией в районах 1C *An. messeae* и 3C *An. atroparvus* точки разрыва фиксированной инверсии. При этом район контакта с ядерной ламиной у предкового вида не был разделен инверсией на две части, а оставался только по одну сторону от точки разрыва. Можно предположить другое объяснение полученным результатам. Различия в локализации районов взаимодействия хромосом с ядерной ламиной у *An. messeae* (район 1C) и *An. atroparvus* (район 3A) не связаны с хромосомными перестройками, а произошли путем передачи последовательностей ДНК, ответственных за прикрепление, от одного района другому. Такую передачу могли бы обеспечить мобильные генетические элементы (Avramova et al., 1998).

Авторы планируют провести более подробный анализ реорганизации архитектуры X-хромосомы трофоцитов в ходе эволюции малярийных комаров, привлекая другие близкие виды *Anopheles* комплекса *maculipennis*.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы повышения конкурентоспособности Томского государственного университета.

РОЛЬ ПРОТЕАСОМ В ОСНОВНЫХ ФУНКЦИЯХ ЯДРА: ОБЗОР И НОВЫЕ ГИПОТЕЗЫ. © И. Г. Архипов. Национальный медицинский университет им. А. А. Богоольца, Киев, Украина, fichino@mail.ru

Система убиквитинзависимого протеасомного протеолиза (УПП) выполняет функцию специфической нелизосомной деградации внутриклеточных белков и имеет важное регуляторное значение. Известные на сегодняшний день функции протеасомы связаны в основном с ее протеолитическими активностями, однако все больше работ посвящается непротеолитическим активностям протеасомы, в том числе эндорибонуклеазной и АТФазной, показывая, что участие протеасомы в клеточных процессах осуществляется комплексно. УПП участвует практически во всех процессах в клетке, в том числе в выполнении всех базисных функций ядра клетки — хранения, передачи и реализации генетической информации.

Хранению генетической информации УПП способствует за счет участия в процессах репарации ДНК, как за счет прямого воздействия на ферменты эксцизионной репарации, так и за счет деградации коровых гистонов.

В передаче генетической информации важна регуляция прохождения клеточного цикла за счет УПП-зависимой регуляции циклинзависимых киназ деградации реплисомы. В сперматогенезе при метаморфозе ядра будущего сперматозоида УПП деградирует коровые гистоны, способствуя уплотнению хроматина.

Особого внимания, на наш взгляд, заслуживает то, что УПП принимает участие практически на всех этапах реализации генетической информации. Так, на этапе транскрипции деградация транскрипционных факторов, их активаторов и коактиваторов нужна для своевременного «выведения их из игры». Более того, УПП обеспечивает привлечение некоторых активаторов к промоторной области генов и мaturацию комплексов элонгации.

Также было показано, что многие факторы УПП принимают участие в процессе сплайсинга РНК. Убиквитинированием регулируется активность ряда факторов сплайсинга, и недавно такой механизм регуляции был описан для участующего в процессинге пре-мРНК hPrp19. Также в процессинге РНК участвует субъединица DSS1 путем регуляции активности специфических для двухцепочечных РНК аденоzin дезамина. Роль регулирующего убиквитинирования в сплайсинге показана также для Prp8, U4/U6-U5 snRNP. Однако свидетельства о влиянии ингибитора протеасомы MG132 на 24 фактора сплайсинга наталкивают на мысль о непосредственном участии протеасомы в сплайсинге, что еще предстоит проверить. Помимо этого, было показано, что УПП способствует облегчению экспорта РНК из ядра.

Для всех трех функций необходимы обеспечение динамики ядерного матрикса, а также ремоделирования хроматина. УПП задействован в деградации бета-катенина как основного компонента ядерного матрикса, что может свидетельствовать о возможной роли УПП в регуляции динамики ядерного матрикса. А также протеасома участвует в ремоделировании хроматина как за счет протеолитических, так и за счет АТФазной активностей. Бо-

льее того, убиквитинирование гистонов является одним из эпигенетических механизмов регуляции генома.

Не менее интересной оказывается весьма специфичная эндонуклеазная активность протеасомы, которая показана в отношении рРНК и мРНК, содержащих AUUA-повторы и не только. Учитывая вышеупомянутое участие протеасомы в мaturации мРНК, мы допускаем гипотезу о непосредственном участии протеасомы в созревании и стабильности не только мРНК, но и некодирующих РНК.

Таким образом, анализ функций протеасомы в ядре клетки показывает ее широкий спектр участия в регуляции многих ключевых аспектов его деятельности. Мы видим особо перспективным изучение роли УПП в регуляции некодирующих РНК.

ВЛИЯНИЕ СТАТУСА МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК НА СТРУКТУРНУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ РИБОНУКЛЕОПРОТЕИНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ ЯДЕР МЕРИСТЕМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ПШЕНИЦЫ *TRITICUM AESTIVUM*. © Е. Н. Баранова,¹ Е. М. Лазарева.² ¹ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, greenpro2007@rambler.ru, и ² Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

Существенной составляющей эпигенетической регуляции генома эукариот является метилирование ДНК, которое происходит путем присоединения метильной группы к цитозину в составе CpG-динуклеотида в позиции C5 цитозинового кольца. Снижение метилирования необходимо для активации транскрипции. Деметилирование может быть вызвано экспериментально с помощью аналога основания ДНК 5-азаЦИДР (5-азаЦ). АЦ включается в ДНК в ходе репликации и действует как ингибитор метилазы, снижая, таким образом, уровень метилирования ДНК. Моделью для анализа влияния деметилирования на экспрессию являются гены, кодирующие р-РНК (Chen, Pikaard, 1997). В работе изучено влияние аналога основания ДНК 5-азаЦ на ультраструктурную организацию ядерных компартментов клеток меристемы корней пшеницы. В экспериментах использовали 5-азаЦ в трех различных концентрациях — 25, 100 и 500 мкМ, время воздействия — 30 ч. Изменение уровня метилирования ДНК оценивали биохимическим методом, в качестве цитологического маркера изменения уровня метилирования использовали серебрение латентных организаторов ядрышек в митотических хромосомах (Chen et al., 1998). Ультраструктуру ядер изучали методом ТЭМ. В контроле интерфазные клетки меристемы пшеницы содержат от 1 до 4, реже 5—6 ядрышек, различающихся по размерам. В метафазных пластинках выявляются две пары гомологичных хромосом с активными ядрышковыми организаторами (ЯО), по центромерному индексу и морфологии соответствующими хромосомам 1B и 6B. ЯО визуализируются как компактные блоки или протяженные аргентофильные структуры. После обработки 5-азаC на препаратах метафазных пластинок выявляются дополнительные локусы серебрения, хотя встречаются метафазные клетки, содержащие активные ЯОР только на хромосомах 1B и 6B. При концентрациях 5-азаЦ 25 и 100 мкМ таких клеток большинство (70 %), в то время как при концентрации 500 мкМ все метафазные пластинки имеют активированные латентные ЯОР. Эти данные свидетельствуют об

активации генов, кодирующих рРНК, в хромосомах, содержащих латентные организаторы ядрышек. На макро- и ультраструктурном уровнях выявлены следующие эффекты действия азаситидина: 1) частично блокируется рост корней уже при концентрации 25 мкМ; 2) частично ингибируется пролиферативная активность клеток мери-стемы; 3) в ядрах интерфазных клеток возрастает количество ядрышек, при концентрациях 5-азаЦ 100 и 500 мкМ встречаются клетки (1—2 на 1000), содержащие 10 ядрышек и более; 4) при дозах 5-азаЦ 100 и 500 мкМ в некоторых ядрах формируются множественные (от 5—8 до нескольких десятков на ядро) аргентофильные структуры; 5) по данным электронной микроскопии, в ядрах после действия 5-азаЦ формируются следующие структурные комплексы: скопления фибриллярных РНП-частиц в виде трубочек (30—40 нм), овальные структуры, состоящие из фибрилл, обогащенных гранулами (микроядрышки), фибриллярные комплексы (пуффи). 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 (потеря части гранулярного компонента, появление в центральной области декомпактизированного хроматина) и контрактация РНП-комплексов 2-го и 3-го типов. Полученные данные обсуждаются в рамках гипотезы о нескольких типах организации транскрипционно активных локусов хромосом.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О СТРОЕНИИ И ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ЯДЕРНОГО АППАРАТА ДИАТОМОВЫХ ВОДОРОСЛЕЙ. © Е. Д. Бедошвили. Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, bedoshvili@lin.irk.ru

Диатомовые водоросли (отдел Bacillariophyta) — одноклеточные эукариотические организмы. На долю диатомей, обитающих в мировом океане, приходится 20 % глобальной первичной продукции органического вещества. Особенностью этой группы водорослей является наличие кремнеземного экзоскелета, элементы которого формируются внутриклеточно и имеют видоспецифическое строение. Большая часть исследований диатомовых водорослей посвящена именно кремнеземным панцирям, а исследования строения клеток сравнительно редки. Однако в последнее время цитологические данные, такие как особенности ядерного аппарата, используются для поддержки различных филогенетических гипотез.

В клетках диатомей единственное ядро лежит в центре клетки, на одной из створок или рядом с поясковыми ободками. У большинства диатомовых водорослей ядро эллипсоидное или сферическое, но встречаются и некоторые интересные исключения: конусовидное ядро (*Aulacoseira*), двудольное ядро (*Lauderia annulata* Cleve), ядро Н-образной формы (*Surirella Turpin*), ядро с двумя нитевидными выпячиваниями, тянущимися к полосам клетки (*Synedra ulna*), глубокие инвагинации, в которые иногда заходят цистерны ЭПР (*Synedra acus*). Хотя точное значение этих модификаций не выяснено, предполагается, что они могут способствовать увеличению поверхности ядра и ускорению транспорта веществ.

В современных исследованиях взаимное расположение ядра и аппарата Гольджи используется для поддержки филогенетических исследований. Медлин и Качмарска

(Medlin, Kaczmarcka, 2004) систематизировали данные о характере расположения аппарата Гольджи в клетках диатомей и выделили три типа: 1) диктиосомы ассоциированы с цистерной ЭПР и митохондриями (центрические водоросли с радиальной симметрией, за исключением порядка Aulacoseirales); 2) диктиосомы окружают ядро и образуют вокруг него оболочку (диатомеи из порядков Thalassiosirales и Aulacoseirales Crawford, большинство пеннатных и биполярных центрических диатомей); 3) наружная оболочка ядра образует выпячивания, вдоль которых располагаются пары диктиосом (*Biddulphiopsis titiana* (Grunow) von Stosch & Simonsen).

Подавляющее большинство данных о таком важном аспекте, как количество хромосом у диатомей, было получено в первой половине XX в. Было показано, что в метафазе хроматин формирует плотное кольцо, в котором обычно невозможно различить отдельные хромосомы, поэтому количество хромосом определяли в профазе мейоза или митоза. Данные о количестве хромосом, полученные только для 44 из тысяч известных видов, используются для подтверждения нескольких гипотез об эволюции диатомей.

В течение клеточного цикла положение, занимаемое ядром, может быть различным. Для центрических и пенатных видов порядок этих перемещений различается. Во всех случаях ядро делится, когда находится напротив поясковых ободков. Позже дочерние ядра могут оставаться тесно связанными со створкой, пока она формируется, затем дочернее ядро отделяется от створки и занимает свое интерфазное положение. С поверхностью ядра связано электронно-плотная гранула и микротрубочковый центр. При митозе микротрубочковый центр трансформируется в веретено деления.

Таким образом, рассмотрение цитологических данных, таких как число хромосом и клеточное строение, особенно перспективно для поддержки различных теорий об эволюции диатомей.

ПРИМЕНЕНИЕ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ В ИССЛЕДОВАНИИ ОРГАНИЗАЦИИ МАКРО-НУКЛЕУСА ИНФУЗОРИЙ. © К. А. Бенкен, Е. В. Сабанеева. С.-Петербургский государственный университет.

Атомно-силовая микроскопия (ACM) позволяет получать информацию о поверхности биологических объектов без предварительной фиксации материала и строить трехмерное изображение объекта с высоким уровнем разрешения. При исследовании организации ядерного материала применение ACM в сочетании с ферментативной обработкой дает возможность определить природу анализируемой структуры, в частности дифференцировать ДНП- и РНП-комплексы, а предварительная обработка фаллоидином, конъюгированным с биотином, с последующей инкубацией с комплексом стрептавидин — коллоидное золото позволяет определить локализацию ядерного актина в отдельных компартментах. Одновременное применение ACM и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии с использованием флуоресцентно меченного фаллоидина нередко практикуется в качестве контрольного эксперимента.

Подобные подходы применялись для получения трехмерного изображения экстрахромосомных ядрышек и хроматиновых телец макронуклеусов инфузорий. Выделенный из ядра материал исследовали полуконтактным

методом АСМ. Полученные трехмерные изображения экстрахромосомных ядрышек хорошо согласуются с данными трансмиссионной электронной микроскопии и подтверждают высказанную ранее гипотезу о субъединичном строении сложных ядрышек инфузорий. Субъединица ядрышка имеет бобовидную форму, а в ее центре располагается сферическое хроматиновое тельце.

Обсуждается возможность получения трехмерного изображения микрохромосом макронуклеуса.

КАРИОСФЕРА И ЕЕ КАПСУЛА — УНИКАЛЬНЫЕ СТРУКТУРЫ ЯДЕР РАСТУЩИХ ООЦИТОВ. © Д. С. Боголюбов,¹ А. М. Киселев,^{1,2} Ф. М. Баталова,¹ И. С. Степанова,¹ О. И. Подгорная.^{1,3} ¹Институт цитологии РАН, dmitr@mail.cytspb.rssi.ru, ²Федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, и ³С.-Петербургский государственный университет.

В сообщении представлен обзор собственных и литературных данных о строении, молекулярном составе и динамике кариосферы (кариосомы) — особой эволюционно консервативной форме существования хромосомного аппарата в ядре растущих ооцитов (реже сперматоцитов) многих животных. Кариосфера формируется в результате концентрации всех хромосом половой клетки в ограниченном объеме ядра. Ее функции и биологическое значение остаются практически неизвестными, несмотря на более чем 100-летнюю историю изучения. Считают, что формирование кариосферы представляет собой один из механизмов инактивации хромосом и подготовки их к последующему редукционному делению. В большинстве случаев хромосомы, собранные в кариосферу, ассоциированы с экстрахромосомным материалом различной природы. Иногда плотно упакованный экстрахромосомный материал формирует особую внешнюю структуру — капсулу кариосферы, изолирующую хроматин от остальной части нуклеоплазмы. Сложно устроенные капсулы развиваются при сохранении кариосферой остаточной транскрипции, которая связана с перихроматиновым компартментом — богатой перихроматиновыми фибрillами пограничной зоной между блоками конденсированного хроматина и внутренней частью капсулы.

Традиционно капсулу кариосферы рассматривают как специализированный элемент ядерного матрикса. Мажорными белками капсулы кариосферы исследованных объектов являются, в частности, F-актин и ламин B. Исследования последних лет показали, что в капсule кариосферы сконцентрирована значительная часть РНК ядра ооцита (по данным обработки препаратов изолированных ядер акридиновым оранжевым). Среди РНК капсулы кариосферы (на примере лабораторного насекомого *Tribolium castaneum*) выявлены полиаденилированные РНК (опыты с микроинъекциями флуоресцентно меченых метилолигорибонуклеотидных зондов, комплементарных поли(A)-«хвостам» РНК) и малые ядерные (sn) РНК (данные конфокальной и иммуноэлектронной микроскопии). Однако отличного от snРНК фактора сплайсинга SC35 (SR-белок) в составе капсулы кариосферы не обнаружено. Наоборот, РНК-связывающий белок Y14 — фактор сплайсинга и один из центральных компонентов комплекса связи экзонов (EJC) — входит в состав капсулы кариосферы. Его локализация подтверждена с помощью микроинъекций в оплазму синтезированной in

vitro с помощью методов генной инженерии 5'-кэпированной мРНК, несущей в своем составе кодирующие последовательности белка Y14 и тус-эпитопа в качестве метки (tag). Помимо капсулы кариосферы слитый белок Y14-тус был локализован в перихроматиновом компартменте кариосферы в условиях сохранения остаточной транскрипционной активности в поздних вителлогененных ооцитах.

Дальнейшие исследования должны расширить представления о капсule кариосферы как об особом экстрахромосомном домене ядер растущих ооцитов. По-видимому, капсula кариосферы представляет собой не только структурный «скаффолд», поддерживающий кариосферу (конденсированные хромосомы) в определенном участке крупного ядра ооцита. Она может являться специализированной структурой, участвующей в хранении и упаковке продуктов хромосомной активности и молекулярных факторов экспрессии генов при сохранении кариосферой остаточной транскрипционной активности.

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

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ КОМПАРМЕНТАЛИЗАЦИИ ЯДРА НА НАЧАЛЬНЫХ СТАДИЯХ ЭМБРИОГЕНЕЗА МЛЕКОПИТАЮЩИХ. © И. О. Боголюбова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ibogol@mail.ru

Ядра ранних эмбрионов млекопитающих представляют собой своеобразную и динамичную модель для изучения процессов пространственной организации экспрессии генов. Как известно, в начале эмбрионального развития в несколько этапов проходят процессы активации эмбрионального генома, которые сопровождаются не только выраженным изменениями транскрипционной активности и профиля синтезируемых белков, но и структурными перестройками на субклеточном уровне, которые затрагивают различные ядерные домены. Специфика структурно-функциональной организации ядер ранних эмбрионов млекопитающих помимо значительных изменений транскрипционной активности определяется также процессами формирования ядерных доменов de novo, которые начинаются с момента образования мужского и женского пронуклеусов. В связи с этим ядра эмбрионов млекопитающих обладают целым рядом характерных особенностей своей доменной организации по сравнению с ядрами соматических клеток.

В числе таких особенностей в первую очередь следует отметить особые структуры, описанные в эмбрионах всех изученных млекопитающих, — проядрышки (nucleolus precursor bodies). На эмбрионах разных животных показано, что эти домены дают начало функционально активным ядрышкам. В то же время накопленные данные позволяют предположить, что проядрышки могут быть также вовлечены и в другие морфофункциональные преобразования ядерных структур помимо нуклеоленеза. Другим интересным феноменом, характерным для раннего эмбриогенеза млекопитающих, является морфологическая и молекулярная гетерогенность популяции коилин-содержащих телец, описанная для ранних стадий дробления эмбрионов мыши. Данное наблюдение требует дальнейших исследований с целью установления степени

соответствия этих телец каноническим тельцам Кахала. Кроме того, ранние этапы эмбриогенеза млекопитающих характеризуются интенсивными процессами внутриядерного перераспределения основных компонентов транскрипции и посттранскрипционного метаболизма мРНК и формирования дефинитивного молекулярного состава ряда универсальных ядерных доменов, например кластеров интерхроматиновых гранул.

В докладе будет представлен обзор собственных и литературных данных о динамике структурно-функциональных преобразований основных ядерных доменов в раннем эмбриогенезе мыши в контексте событий активации эмбрионального генома.

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

ВЛИЯНИЕ ГИПОТОНИЧЕСКОГО СТРЕССА НА ВНУТРИЯДЕРНУЮ ЛОКАЛИЗАЦИЮ АКТИНА У ДВУХКЛЕТОЧНЫХ ЗАРОДЫШЕЙ МЫШИ. © Н. А. Богоявленова,¹ В. В. Матреничев.² ¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, nataly_bogoly@mail.ru, и ²С.-Петербургский государственный политехнический университет.

Несмотря на впечатляющие успехи, достигнутые в изучении биологии ядерного актина, целый ряд особенностей функционирования этого белка в ядре остается недостаточно исследованным. В частности, ощущается недостаток сравнительных данных об организации актинового компонента кариоскелета в ядрах клеток разного типа и происхождения; пока остается неясным, существует ли актин в клетке в форме единого пула или же ядерной и цитоплазматической субпопуляций; остается необъясненным феномен появления в ядре полимерного актина в ответ на стрессовое воздействие на клетку.

В данной работе мы представляем сведения о влиянии гипотонического стресса, а именно снижения осмотичности культуральной среды в 2 раза по сравнению с оптимальным значением, на локализацию актина в ядре и цитоплазме зародышей мыши, находящихся в конце двухклеточной стадии развития. Мы использовали флуоресцентный коньюгат ДНКазы I для мечения мономерного актина, TRITC-фаллоидин — для фибрillлярного актина, а также антитела к фрагменту N-концевого домена актина, которые визуализируют актин без учета принимаемых им функциональных форм.

В ядрах контрольных зародышей меченный фаллоидином фибрillлярный актин обнаружен не был, нуклеоплазма содержала мономерный актин, однако проядрышки — ассоциированные с конденсированным хроматином ядерные структуры, типичные для раннего эмбриогенеза млекопитающих, флуоресцентной ДНКазой I не метились. Иммунофлуоресцентное мечение актина подтверждало наличие актина в нуклеоплазме при его отсутствии в составе проядрышек.

У помещенных в гипотонические условия зародышей в течение первых 10—15 мин происходило увеличение объема бластомеров до той максимальной величины, которая может быть достигнута в пределах блестящей оболочки. После окрашивания флуоресцентной ДНКазой I у большинства зародышей наблюдали отсутствие свечения ядер, что может указывать либо на резкое снижение в них

содержания мономерного актина, либо на появление конкурентной по отношению к маркеру ассоциации мономеров актина с каким-либо белком. В ядрах эмбрионов появился ранее там отсутствовавший меченный фаллоидином актин, который визуализировался в нуклеоплазме, но не в проядрышках.

Описанный выше характер распределения мономерного и фибрillлярного актина наблюдался и в ядрах эмбрионов, инкубированных в гипотонической среде в течение 30—40 мин, когда благодаря функционированию регуляторных механизмов объем бластомеров уменьшается почти до нормы. Однако характер мечения ядер таких зародышей антителами к фрагменту N-концевого домена молекулы актина существенно отличался от наблюдавшегося в контрольной группе: после воздействия гипотонии в границах ядер бластомеров наблюдалось равномерное свечение, места локализации проядрышек могли быть выявлены только при использовании двойного окрашивания DAPI.

Основываясь на наших наблюдениях, можно предположить, что в ранних эмбриональных ядрах гипотонический стресс индуцирует полимеризацию содержащегося в них мономерного актина и что у зародышей, успешно компенсировавших резкое увеличение объема, часть ядерного актина, не являющегося ни мономерным, ни фибрillлярным, солокализована с проядрышками.

ВЛИЯНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА НА ДИНАМИКУ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА МЕЗЕНХИМНЫХ И ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА. © Я. Г. Борисов,¹ О. Г. Люблинская,¹ Ю. В. Обидина,² Ю. С. Иванов,² Н. А. Пуговкина,¹ Н. Н. Никольский.^{1,2} ¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и ²Отделение медицинской физики и биоинженерии С.-Петербургского государственного политехнического университета, gis.ib88@gmail.com

В настоящее время доказано, что активные формы кислорода (АФК) участвуют в регуляции клеточной пролиферации, выступая медиаторами фосфорилирования и убиквитинирования ключевых молекул клеточного цикла (Verbon et al., 2012). В работах (Menon et al., 2003; Havens et al., 2006) для фибробластов и трансформированных клеток человека и мыши показано, что существует взаимосвязь между прогрессией клеточного цикла и внутриклеточным уровнем АФК. На поздней G₁-стадии цикла наблюдается повышение уровня эндогенных АФК, который достигает максимума на границе между G₁- и S-фазами. В то же время обработка клеток антиоксидантами приводит к остановке клеточного цикла на границе G₁—S. Комплексный молекулярный анализ (Havens et al., 2006) показал, что арест клеточного цикла, обусловленный действием антиоксидантов, вызван неспособностью клеток накопить циклины-A, убиквитинируемые APC/C-комплексом, который в обычных условиях инактивируется в поздней G₁-фазе цикла. Таким образом, данные наблюдения указывают на то, что существует АФК-опосредованный механизм регуляции прохождения G₁—S-фаз клеточного цикла в соматических клетках. Однако информация о работе данных механизмов в стволовых клетках отсутствует. Целью настоящей работы было изучить влияние АФК на динамику перехода G₁—S в мезенхимных и эмбриональных стволовых клетках человека.

В качестве объекта исследования использовали культуры эндометриальных (эМСК) и эмбриональных (ЭСК) стволовых клеток человека, полученных и охарактеризованных в Институте цитологии РАН (Кожухарова и др., 2009; Земелько и др., 2011). Уровень эндогенных АФК измеряли методом проточной цитометрии. Для синхронизации эМСК в G₀/G₁-фазе цикла использовали метод контактного торможения или перевода клеток на бессывороточную среду. В случае ЭСК синхронизацию осуществляли в фазе G₂/M нокадазолом. Для понижения внутриклеточного уровня АФК применяли антиоксиданты Tempol и N-acetyl-L-cysteine (NAC) в диапазоне концентраций от 1 до 10 мМ, а также ресвератрол в концентрации 20–60 мкМ.

Эксперименты с синхронными культурами эМСК показали последовательное повышение уровня АФК, предшествующее переходу в S-фазу клеточного цикла. Обработка антиоксидантами привела к снижению эндогенного уровня АФК и блокированию на границе S-фазы. Исследование синхронных культур ЭСК не показало достоверного изменения уровня АФК на протяжении клеточного цикла. Однако обработка антиоксидантами приводила к G₁-аресту клеточного цикла как синхронных, так и асинхронных культур ЭСК. Таким образом, наши эксперименты доказывают влияние АФК на динамику клеточного цикла стволовых клеток человека. Выяснение механизмов АФК-зависимой регуляции цикла требует молекулярного анализа, который проводится в данный момент.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-01903-а).

РОЛЬ p38MAPK В РАЗВИТИИ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОГО СТАРЕНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА. © A. В. Бородкина, A. Н. Шатрова, H. H. Никольский, E. B. Бурова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, borodkina618@gmail.com

В последнее время исследование феномена клеточного старения стволовых клеток получило широкое распространение. Считается, что именно старение ткане-специфичных стволовых клеток лежит в основе общего старения организма. Более того, было показано, что эффективность использования этих клеток в регенеративной медицине в значительной степени зависит как от возраста донора, так и от возраста реципиента (при трансплантации пожилым реципиентам стволовые клетки донора помещаются в неблагоприятное микроокружение, что может индуцировать их старение). Таким образом, разработка стратегий «омоложения» (предотвращения старения) стволовых клеток имеет непосредственную практическую значимость.

Ранее нами было показано, что действие H₂O₂ в сублетальной концентрации (200 мкМ) в течение 1 ч индуцирует преждевременное старение мезенхимных стволовых клеток эндометрия человека (СКЭ). Основными характерными признаками процесса старения являются необратимая остановка пролиферации вследствие блока клеточного цикла, а также развитие фенотипа старения (увеличение размера клеток и SA-β-Gal-активности). При исследовании механизма индуцированного старения СКЭ

мы обнаружили быструю (через 5 мин после добавления H₂O₂) активацию стресс-киназы p38, которая сохранялась в течение всего периода наблюдения (минимум 8 сут). Эти результаты позволяют предположить вовлеченность киназы p38 в процесс как индукции, так и установления H₂O₂-индуцированного старения СКЭ. С целью подтверждения роли p38MAPK был использован специфический ингибитор SB203580 (SB). На основании оценки выживаемости клеток при действии SB методом МТТ нами была выбрана концентрация 5 мкМ, которая практически не влияла на жизнеспособность СКЭ. Для выбора условий обработки SB было проверено несколько подходов: 1) предобработка SB в течение 40 мин, 2) добавление ингибитора через 1 сут после индукции старения либо 3) сразу после обработки H₂O₂ при дальнейшем постоянном присутствии SB в культуральной среде. Несмотря на то что в первых двух вариантах мы наблюдали незначительные фенотипические изменения (уменьшение размера клеток и SA-β-Gal-окраски), такие способы обработки H₂O₂-стимулированных СКЭ не приводили к восстановлению пролиферации. Наиболее эффективным оказался третий подход, который позволил предотвратить перманентное ингибирование роста клеток, вызываемое действием H₂O₂, и развитие фенотипических изменений, связанных со старением. Интересно, что добавление SB вне зависимости от способа приводило к значительному уменьшению уровня внутриклеточных активных форм кислорода (АФК), повышение которых характерно для старых клеток. Исходя из того что митохондрии являются основным источником внутриклеточных АФК, далее мы проверили влияние SB на функционирование митохондрий. Оказалось, что ингибирование p38 способствовало уменьшению уровня митохондриальных пероксидов, снижению митохондриальной массы и пропорциональному снижению митохондриального потенциала. Можно предположить, что в стареющих СКЭ p38MAPK вовлекается в продукцию АФК, опосредованную увеличением числа функционирующих митохондрий.

На основании полученных результатов можно заключить, что киназа p38 участвует как в инициации, так и в развитии преждевременного старения в СКЭ в условиях окислительного стресса, тогда как ингибирование ее активности частично предотвращает индукцию старения.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ N-АЦЕТИЛ-L-ЦИСТЕИНА ДЛЯ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ H₂O₂-ИНДУЦИРОВАННОГО ПРЕЖДЕВРЕМЕННОГО СТАРЕНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА. © A. В. Бородкина, A. Н. Шатрова, H. H. Никольский, E. B. Бурова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, borodkina618@gmail.com

Известно, что активные формы кислорода (АФК), такие как O₂^{•-}, OH[•], O₂ и H₂O₂ участвуют в регуляции множества клеточных процессов, включая пролиферацию, дифференцировку, опухолевую трансформацию, апоптоз и клеточное старение. В последнее десятилетие клеточное старение, определяемое как необратимый арест клеточного цикла, принято считать характерной реакцией пролиферирующих клеток на сублетальные стрессовые воздействия различной природы (UV- и γ-излучение, H₂O₂, ингибиторы гистондеацетилазы и т. д.). Ранее мы показали, что стволовые клетки эндометрия человека

(СКЭ) в ответ на действие H_2O_2 в сублетальной концентрации (200 мкМ) входят в состояние преждевременного старения, характеризующееся блоком клеточного цикла, необратимым торможением пролиферации, гипертрофией клеток и увеличением активности SA- β -Gal. Используя флуоресцентный краситель $H_2DCF-DA$ (10 мкМ), мы обнаружили, что H_2O_2 быстро проникала внутрь клеток, и уже через 15 мин уровень внутриклеточных АФК в H_2O_2 -обработанных клетках достигал максимального значения, однако через 1 ч уровень АФК падал ниже контрольного, вероятно за счет активации ферментов антиоксидантной защиты. Следовательно, экзогенная H_2O_2 полностью утилизировалась клетками в течение 1 ч. Через 5 ч после окончания обработки уровень эндогенных АФК постепенно увеличивался (вплоть до 5 сут) и далее поддерживался на высоком уровне. Таким образом, очевидно, что развитие старения в СКЭ связано с повышенной продукцией АФК. Представлялось интересным исследовать действие веществ, снижающих продукцию АФК в H_2O_2 -стимулированных СКЭ, с целью предотвращения старения. Были использованы антиоксиданты различного спектра действия: дифенилениодония хлорид (DPI) — ингибитор НАДФ·Н-оксидазы и N-ацетил-L-цистеин (NAC) — предшественник синтеза глутатиона. В результате обработки DPI (0.25 мкМ) наблюдали лишь небольшое снижение уровня АФК в H_2O_2 -стимулированных клетках, уменьшение размера клеток и активности SA- β -Gal. Существенный недостаток действия DPI заключался в индукции блока клеточного цикла в фазе G₁, приводящего к остановке пролиферации как контролльных, так и H_2O_2 -обработанных клеток. Принимая во внимание вышесказанное, дальнейшее исследование DPI как возможного регулятора процесса старения было прекращено. При выборе условий обработки клеток NAC (10 мкМ) было выявлено, что постоянное присутствие антиоксиданта в ростовой среде приводит к существенному изменению морфологии СКЭ и торможению пролиферации, поэтому NAC сразу удаляли из инкубационной среды после H_2O_2 -обработки. Были протестированы два варианта: 1) предобработка NAC с последующим действием H_2O_2 в присутствии антиоксиданта; 2) совместное действие NAC и H_2O_2 . Использование обоих вариантов приводило к значительному подавлению уровня эндогенных АФК, причем этот эффект сохранялся в течение длительного времени, несмотря на удаление NAC после окончания инкубации с H_2O_2 . Тем не менее предотвращение развития старения клеток обеспечивало использование только 2-го варианта. При этом наблюдали существенное восстановление пролиферации, уменьшение активности SA- β -Gal и размера клеток по сравнению с H_2O_2 -обработанными клетками. Полученные данные свидетельствуют о том, что процесс индуцированного стрессом старения в СКЭ связан с постоянно повышенной продукцией АФК, тогда как снижение уровня АФК при использовании NAC приводит к частичному предотвращению преждевременного старения клеток.

ДИНАМИКА ТРЕХМЕРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ПРИЦЕНТРОМЕРНЫХ РАЙОНОВ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ ТРОФОЦИТОВ В ООГЕНЕЗЕ *DROSOPHILA MELANOGASTER*. © И. Э. Вассерлауф, К. Е. Усов, В. Н. Стегний. Национальный исследовательский Томский государственный университет, I-2811-na@yandex.ru

Ранее нами показано, что прицентромерные районы хромосом X и 3 в ядрах трофоцитов яичников *Drosophila melanogaster* близко ассоциированы по отношению друг к другу, а хромосома 2 располагается напротив них. Кроме того, иногда выявлялись ядра с другим типом взаимного расположения хромосом — прицентромерные районы хромосом 2 и 3 сближены друг с другом, а хромосома X обособлена от них. Мы предположили, что выявленные разные морфотипы ядер трофоцитов связаны с наличием динамики пространственной организации прицентромерных районов хромосом на разных стадиях оогенеза. Для подтверждения этого предположения был использован метод 3D-иммунофлуоресцентной микроскопии. В результате иммунофлуоресцентной локализации антител против белков ламина Dm0 и HP1 в интактных ядрах трофоцитов *D. melanogaster* удалось визуализировать ядерную оболочку и прицентромерные районы всех хромосом. Далее нами был проведен анализ пространственного расположения прицентромерных районов хромосом в ядрах трофоцитов овариол яичников. В каждой овариоле мы изучали по три фолликула, в которых содержались ядра с хромосомами, пригодными для анализа. В первом фолликуле прицентромерные районы хромосом 2 и 3 близко расположены друг к другу и контактируют с оболочкой ядра, а X-хромосома обособлена от них и контактирует с оболочкой ядра не только прицентромерным районом, но и теломерным (1-й морфотип ядер трофоцитов). Таких ядер в среднем выявлялось около 65 %. В остальных ядрах прицентромерные районы всех хромосом, контактирующие с оболочкой ядра, равномерно удалены друг от друга (2-й морфотип ядер трофоцитов), причем такое расположение хромосом, как правило, выявлялось у ядер, близко расположенных к ооциту. Ядер с таким морфотипом во втором фолликуле наблюдалось больше, чем в первом фолликуле; их число составляло от общего числа ядер в одном фолликуле около 47 %. В то же время ядер с 1-м морфотипом становилось меньше (40 %). Также во втором фолликуле наблюдался и другой морфотип (3-й морфотип ядер трофоцитов) — прицентромерные районы хромосом X и 3, контактирующие с оболочкой ядра, близко расположены друг к другу, а прицентромерный район хромосомы 2 удален от них. Таких ядер в третьем фолликуле выявлялось больше, чем во втором, около 44 %, а ядер с 1-м морфотипом наблюдалось намного меньше, около 20 %. Полученные нами результаты показали, что в ходе оогенеза образуются три морфотипа ядер трофоцитов. На ранних стадиях оогенеза прицентромерные районы хромосом 2 и 3 образуют диффузный хромоцентр, а X-хромосома обособлена от них, на более поздних стадиях оогенеза прицентромерный район хромосомы 3 отделяется от хромосомы 2, а затем выявляется вблизи с прицентромерным районом X-хромосомы.

Таким образом, у *D. melanogaster* в ядрах трофоцитов на разных стадиях оогенеза выявлена динамика пространственной организации прицентромерных районов политетенных хромосом, что, вероятно, имеет какое-то функциональное значение.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта компании ОПТЭК (2014 г.), а также при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-01625).

ОТ ПОЛИТЕНИИ К ПОЛИПЛОИДИИ: ПРЕОБРАЗОВАНИЕ СТРУКТУРЫ ХРОМОСОМ В ЯДРАХ ТРОФОЦИТОВ *CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA* MG (CALLIPHORIDAE: DIPTERA). © А. Е. Веденников, В. Н. Стегний. Национальный исследовательский Томский государственный университет, genes51@mail2000.ru

Ранее было установлено изменение структуры хромосом трофоцитов *Calliphora erythrocephala* (Calliphoridae: Diptera) на ранних стадиях развития имаго (в первые несколько суток после выхода из пупария). При этом в ядрах трофоцитов первоначально хроматин имеет ретикулярную структуру, затем из отдельных хроматиновых фибрилл формируются политечные хромосомы. В дальнейшем происходит компактизация политечных хромосом, их утолщение и укорачивание — формируются так называемые помпоновидные хромосомы, имеющие округлую форму (Bier, 1958; Стегний, 1999).

Затем в трофоцитах яичников происходит разобщение помпоновидных хромосом на эндохромосомы. Они представляют собой плотно компактизованные мелкие (~1 мкм в толщину и ~3 мкм в длину) парные палочко-видные образования. Очевидно, они являются гомологами политечных хромосом, синтезированных в процессе предшествующих эндомитотических циклов репликации. В результате подсчета нами было установлено, что каждая помпоновидная хромосома (за исключением половой) разобщается на 64 пары эндохромосом. Следует учесть, что теоретически возможное количество эндохромосом, на которое разобщается каждая помпоновидная хромосома, равняется 2^{n+1} , где n — число предшествующих эндоциклов. Соответственно полиденность ядра на этой стадии политечизации составляет 128С количества ДНК.

Современные исследования указывают на аналогичное преобразование хроматина в питающих клетках у дрозофилы (Dej, Spradling, 1999). В этой работе авторы показали сестринскую природу объединенных в пары хроматид, а также то, что хроматиды удерживаются вместе за счет наличия недореплицированных участков ДНК. При этом было доказано, что недорепликация затрагивает лишь эндоцикл, предшествующий разобщению (у *Drosophila* — пятый). На всех более ранних стадиях хромосомы реплицируются полностью. В противном случае объединение хроматид происходило бы не в пары, а в большие по численности группы (2^n).

На основе полученных результатов и литературных данных следует заключить, что пять эндоциклов трофоцитов *C. erythrocephala* характеризуются полной репликацией хроматина. Последующий, шестой, эндоцикл характеризуется укороченной синтетической фазой. В результате оказываются недопредставленными позднореплицируемые домены хромосом. Это и приводит к парному объединению сестринских хроматид и формированию 64-плоидного политечного ядра.

АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ В СТРУКТУРЕ ИНТЕРФАЗНОГО ЯДРА МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ПРОЦЕССЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ. © Я. И. Вольдгорн, А. В. Лавров. Медико-генетический научный центр РАМН, Лаборатория мутагенеза, Санкт-Петербург, amrita86@yandex.ru

Неслучайное, эволюционно консервативное расположение хромосом в ядре, по-видимому, присуще большин-

ству высших эукариот и играет определенную роль в регуляции ряда жизненно важных клеточных процессов, включая клеточную дифференцировку. Активно транскрибируемые хромосомы обычно расположены ближе к центру ядра, в то время как бедные генами и менее активные хромосомы часто смешены к периферии. Хромосома может менять свое положение в ядре по мере увеличения или уменьшения активности транскрипции. В нашей работе при помощи метода FISH, флуоресцентной и конфокальной микроскопии было изучено положение отдельных хромосом в интерфазных ядрах мезенхимных стволовых клеток (МСК) в процессе дифференцировок в адипогенном и остеогенном направлениях. Также было проведено сравнение положения данных хромосом на ранних и поздних пассажах, так как известно, что длительное культивирование клеток может приводить к их спонтанной дифференцировке. Было исследовано 19 клеточных культур, более 400 тыс. ядер. Показано отсутствие значимых различий между данными, полученными с помощью трехмерной и двухмерной микроскопии. Было выявлено более дистальное положение хромосом 18 и 12 в ядрах после адипогенной дифференцировки (для хромосомы 18 медианы ± стандартные отклонения составляют 46 ± 21 и 53 ± 21 % до и после дифференцировки соответственно; для хромосомы 12 медианы ± стандартные отклонения составляют 59 ± 23 и 62 ± 20 %, до и после дифференцировки соответственно), что для хромосомы 12 может быть связано сdezактивацией ряда расположенных на этой хромосоме генов, связанных с мало-дифференцированным статусом клетки. Также были выявлены различия в положении хромосомы X на ранних и поздних пассажах после дифференцировки в остеогенном направлении.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АССОЦИРОВАННОГО С ПРОЛИФЕРАЦИЕЙ ЯДРЕННОГО БЕЛКА Ki-67 В КЛЕТОЧНОМ ЦИКЛЕ ГЕПАТОЦИТОВ. © Е. А. Воротеляк, Г. В. Делоне, А. Л. Риппа, И. В. Урываева. Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, iguyaeva.idb@bk.ru

Ядерный белок хроматина и ядрышек pKi-67 экспрессируется в клетках в фазах G₁, S, G₂ и M митотического цикла, но не экспрессируется в состоянии пролиферативного покоя — фазе G₀. Иммуногистохимическая реакция на антиген pKi-67, выявляющая фракцию роста ткани, особенно клетки в G₁-фазе, используется в медицине для диагностики и прогнозирования ряда опухолей.

Синтез pKi-67 происходит в течение активных стадий, и с прогрессией клеточного цикла содержание его в ядре резко возрастает. В зависимости от позиции клетки изменяются также локализация и связь белка с разными доменами ядра. Если в интерфазном ядре pKi-67 преимущественно выявляется в ядрышках, то на заключительных этапах митоза он обнаруживается в поверхностном белковом слое хромосом.

В настоящей работе экспрессию pKi-67 в клеточном цикле гепатоцитов изучали на моделях регенерации печени мыши. Белок Ki-67 окрашивали методом иммуногистохимии в парафиновых срезах толщиной 2 мкм. В материале работы представлены 2 типа моделей клеточного цикла: выход гепатоцитов в цикл из состояния покоя (G₀—G₁) и повторное циклирование дочерних постмитотических клеток (M—G₁).

Фаза G₁ первого индуцированного цикла (G₀—G₁) продолжается около 24 ч. В пробах печени, взятых через 20—22 ч после стимуляции регенерации, т. е. до начала репликации ДНК, в фазе G₁, практически отсутствуют Ki-67-позитивные гепатоциты. Однако в ткани печени регулярно встречаются окрашенные стромальные клетки печени и лейкоциты в просвете синусоидов. С началом репликации ДНК после 24 ч частота Ki-67-позитивных гепатоцитов коррелирует с уровнем включения бромдезоксиридуина.

Другая модель клеточного цикла относится к популяциям постоянно или повторно циклирующих клеток в опухолях и клеточных культурах, быстро растущих и обновляющихся тканях.

В срезах регенерирующей печени через 3 сут после массивного повреждения, стимулирующего повторные циклы, частота Ki-67 позитивных гепатоцитов достигала 70 %. Среди них до 15 % клеток находятся в мета-ана-тетлофазе митоза и выделяются наиболее яркой окраской. Остальная популяция гепатоцитов содержит клетки в фазах G₁, S и G₂ митотического цикла. В этой популяции в соответствии со структурными особенностями окрашивания белка Ki-67 было выделено 5 типов клеток в соответствии с классификацией, разработанной на основе анализа дополнительных маркеров клеточного цикла культуры эмбриональных стволовых клеток человека (Becker et al., 2006).

Полагают, что после завершения митоза pKi-67 деградирует и в новом цикле синтезируется вновь. В начале следующей постмитотической фазы G₁ (M—G₁) белок Ki-67 выявляется в нуклеоплазме в виде разбросанных в ней многочисленных мелких пятнышек или гранул. Этую короткую стадию расценивают как раннюю фазу G₁. Характерный тип окрашивания ядер в следующей фазе (поздней G₁—ранней фазе S), получившей обозначение «ягуар», определяют крупные подобные ядрышку структуры наряду с более мелкими гранулами. В фазе продолжающейся репликации ДНК (S-фазе) Ki-67-позитивное окрашивание ограничено только ядрышками. В следующей фазе, обозначенной как G₂-тип окрашивания, все ядрышки сливаются, образуя гигантскую долбчатую структуру, окрашенную ярче, чем в предыдущей стадии. В такой структуре могут просматриваться профазные хромосомы.

Описанные нами впервые в соматических клетках структурные особенности экспрессии белка Ki-67 в клеточном цикле являются универсальными, они не зависят от типа клеток и тканей, также и от видовой принадлежности.

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ РИБОСОМНЫХ ГЕНОВ В ООГЕНЕЗЕ ПТИЦ. © Е.Р. Гагинская. С.-Петербургский государственный университет, ele-na.gaginskaya@gmail.com

В отличие от ооцитов рыб и амфибий в ооцитах птиц рибосомные гены не амплифицируются. Синтез ДНК в раннем мейозе приводит к образованию тетраплоидного количества ДНК в ядре, т. е. отражает мейотическую редупликацию хромосом и не связан с амплификацией ядрышкового организатора. Отсутствие амплификации рДНК в оогенезе птиц было показано с использованием методов тимидиновой радиоавтографии (Калинина, Гагинская, 1983) и гибридизации *in situ* (Гагинская, Грузо-

ва, 1975). Более того, в отличие от млекопитающих у половозрелых самок птиц ядрышковые организаторы в ооцитах вообще не функционируют, и соответственно ни на одной из стадий роста ооцита в его ядре не формируется ядрышко (Гагинская, 1972; Gaginskaya et al., 2009). Существуют косвенные свидетельства того, что инактивация рибосомных генов в ядре ооцита у птиц компенсируется активностью клеток фолликулярного эпителия (Press, 1964; Гагинская, Грузова, 1969; Schjeide et al., 1970; Гагинская, Чинь, 1980). Ранее нами показано, что активное поступление РНК неизвестной природы из фолликула в ооцит приурочено к периоду вителлогенеза, т. е. к периоду, когда в ядрах ооцитов других позвоночных рРНК синтезируется наиболее интенсивно (Davidson, 1986). В яичниках кур описаны специфические органеллы (трансосомы), в которых материал (предположительно рибосомы) транспортируется из фолликулярных клеток в цитоплазму ооцита (Press, 1964; Bellairs, 1965; Schjeide et al., 1970; Чинь, Гагинская, 1980). Полный набор хорошо развитых и активных в транскрипции хромосом типа ламповых щеток, с одной стороны, и инактивация рибосомных генов в ооцитах половозрелых птиц — с другой — особенность, принципиально отличающая оогенез представителей класса Aves от оогенеза всех других позвоночных животных. Эта особенность позволяет рассматривать оогенез птиц как промежуточный между автотрофным и гетеротрофным способами развития яйцеклетки.

В то же время в яичнике у неполовозрелых самок популяция зародышевых клеток неоднородна: часть ооцитов ранней диплотенной стадии содержит в ядре одно или два ядрышка, которые функционируют недолго, распадаются на мелкие фрагменты и исчезают до начала в ооците вителлогенеза (Гагинская, Чинь, 1980). На примере цыпленка показано, что содержащие ядрышко ооциты вступают в фазу роста до наступления половой зрелости самки, тогда как ооциты с инактивированным ядрышковым организатором остаются на ранней диплотене и, очевидно, составляют ту часть популяции зародышевых клеток, которая дифференцируется и созревает в гонаде взрослой птицы (Чинь и др., 1979; Гагинская, Чинь, 1980). По данным радиоавтографии и электронной микроскопии, функциональная активность ядрышка в ооцитах цыпленка невелика, а клетки фолликулярного эпителия выполняют ту же функцию, что и в яичниках взрослых самок. Поведение ядрышка в растущих ооцитах неполовозрелых птиц весьма напоминает таковое в ооцитах соответствующих стадий у некоторых рептилий, в частности ящериц, агам и круглоголовок (Куликова, 1963; Аронет, 1969). Динамика, регуляция функциональной активности рибосомных генов в женских половых клетках у птиц и эволюционные аспекты описанного феномена требуют исследования на современном методическом уровне.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта президента РФ НШ-3553.4.2014 и гранта С.-Петербургского государственного университета 1.37.153.2014.

КАРИОТИП КУРИЦЫ В ФАЗЕ ЛАМПОВЫХ ЩЕТОК: ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МИКРОХРОМОСОМ. © С. А. Галкина,¹ А. Ф. Сайфитдинова,¹ А. А. Дакс,¹ В. Фийон,² Е. Р. Гагинская.¹ ¹С.-Петербургский государственный университет, svetlana.galkina@mail.ru, и ²UMR INRA/ENVT, Тулуза, Франция.

Кариотип домашней курицы *Gallus g. domesticus* состоит из 78 хромосом, среди которых 28 пар — микрохромосомы, которые содержат 35 % генома и составляют его часть, обогащенную генами. В наиболее конденсированном состоянии (в метафазе митоза) микрохромосомы имеют длину менее 2 мкм, причем самые мелкие находятся на грани разрешения светового микроскопа. Помимо очень мелких размеров микрохромосомы курицы отличаются от макрохромосом высоким содержанием ГЦ-пар в ДНК и, по-видимому, высоким содержанием повторов. В силу указанных особенностей самые маленькие микрохромосомы не могут быть идентифицированы в «проточном кариотипе» и не отражены в сборке секвенированных последовательностей хромосом курицы (GGA 29—31, 33—38).

В растущих ооцитах курицы все хромосомы преобразуются в так называемые ламповые щетки. На стадии ламповых щеток хромосомы характеризуются высокой транскрипционной активностью, благодаря чему имеют гигантские размеры (примерно в 20—30 раз длиннее соответствующих хромосом на стадии метафазы) и характерную хромомерно-петлевую структуру, благодаря чему каждая хромосома хорошо узнаваема по внешнему виду, что особенно важно для идентификации самых мелких хромосом в наборе.

Для идентификации части микрохромосом и построения их цитогенетических карт мы использовали флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) изолированных из зародышевого пузырька ламповых щеток с имеющимися в нашем распоряжении ВАС-клонами, содержащими фрагменты ДНК микрохромосом средних размеров (GGA 17—28). Используя метод FISH, мы также охарактеризовали микрохромосомы, содержащие tandemный повтор РО41. Несущие РО41 микрохромосомы образуют одну хиазму, хроматин самых мелких из них упакован в два хромомера, и они имеют размер менее 2 мкм на стадии ламповых щеток. Судя по всему, именно эти мелкие ламповые щетки соответствуют неохарактеризованным хромосомам кариотипа *G. g. domesticus*.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта президента РФ НШ-3553.4.2014 и гранта С.-Петербургского государственного университета 1.37.153.2014 с использованием оборудования ресурсного центра «Хромас» С.-Петербургского государственного университета.

ЭКСПРЕССИЯ РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫХ АНТИГЕНОВ СЕМЕЙСТВ MAGE-А И MAGE-В В ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ И ТЕРАТОКАРЦИНОМНЫХ КЛЕТКАХ МЫШИ. © О. Ф. Гордеева. Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, olgagordeva@yandex.ru

Эмбриональные стволовые клетки млекопитающих способны к дифференцировке в соматические и половые клетки *in vivo* и *in vitro*, а также к неограниченному самообновлению, сопоставимому с пролиферативным потенциалом раковых клеток. Эмбриональные тератокарциномные клетки, малигнизированные аналоги плюрипотентных стволовых клеток из опухолей репродуктивных органов, способны лишь к ограниченной дифференцировке. Различные генетические нарушения в плюрипотентных стволовых клетках могут приводить к трансформации и малигнизации, т. е. переходу в статус тератокар-

циномных клеток. Представляет интерес поиск новых маркеров трансформации плюрипотентных стволовых клеток. С этой целью в нормальных плюрипотентных стволовых и эмбриональных тератокарциномных клетках мыши были исследованы профили экспрессии раково-тестикуллярных антигенов семейств Mage-а и Mage-в, которые имеют специфический паттерн экспрессии в раковых клетках различных гистологических типов, а в норме экспрессируются только в некоторых эмбриональных тканях и семенниках взрослых животных.

Для анализа механизмов дифференцировки эмбриональных стволовых клеток и нарушения специализации тератокарциномных клеток мыши были исследованы паттерны экспрессии раково-тестикуллярных антигенов семейств Mage-а и Mage-в в недифференцированных клетках и клетках, стимулированных к дифференцировке ретиноевой кислотой. Количественный ПЦР-анализ экспрессии генов *Mage-a2*, *Mage-a4*, *Mage-a6*, *Mage-a8* и *Mage-b1*, *Mage-b3*, *Mage-b4*, *Mage-b5* показал, что паттерны экспрессии этих генов сходны в эмбриональных стволовых (ЭСК R1) и эмбриональных тератокарциномных (ЭТК F9) клетках мыши. При этом уровень экспрессии *Mage-a2* и *Mage-ab* были значительно выше в недифференцированных ЭТК F9, чем ЭСК R1. Однако профили и уровни экспрессии всех изученных генов были практически идентичны в ЭТК F9 и ЭСК R1, дифференцирующихся под воздействием ретиноевой кислоты. На основании этих данных можно предположить, что гены *Mage-a2* и *Mage-ab* экспрессируются на более высоком уровне в малигнизированных клетках по сравнению с нормальными плюрипотентными эмбриональными стволовыми клетками мыши. Снижение экспрессии этих генов в дифференцирующихся популяциях ЭТК F9 коррелирует с уменьшением числа недифференцированных тератокарциномных клеток. Следовательно, экспрессия ряда антигенов семейств Mage-а и Mage-в может быть ассоциирована с недифференцированным статусом плюрипотентных стволовых и тератокарциномных клеток, причем повышенный уровень экспрессии *Mage-a2* и *Mage-ab* характерен для малигнизированных тератокарциномных клеток. Полученные данные важны для понимания механизмов, регулирующих самообновление и дифференцировку плюрипотентных клеток в норме и при патологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-00419-а).

МНОГООБРАЗИЕ БЕЛКОВ, ФОРМИРУЮЩИХ СИНАПТОНЕМНЫЕ КОМПЛЕКСЫ У ЭУКАРИОТ. © Т. М. Гришаева, Ю. Ф. Богданов. Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва, grishaeva@vigg.ru

В ходе становления и эволюции эукариот мейоз возник одновременно с митозом или вскоре после него (Egel, Penry, 2008). Важным приобретением, отличающим мейоз от митоза, стало формирование временных хромосомных осей, состоящих из мейоз-специфичных белков, которые стали внутриядерным компартментом для локализации ферментов рекомбинации гомологичных хромосом. У высших эукариот одиночные хромосомные оси, соединенные белковыми мостиками, преобразовались в парные структуры — синаптонемные комплексы (СК), что привело к созданию классического мейоза.

В данной работе мы исследовали протеомы примерно 5 тыс. видов организмов из основных таксонов эукариот (изучено более 11 млн белков) и с помощью программы NCBI Protein BLAST провели поиск белков, сходных с известными 33 белками СК семи модельных (для изучения мейоза) видов эукариот от дрожжей до мыши. Аминокислотные последовательности модельных белков СК были взяты из баз данных NCBI и UniProtKB/TrEMBL. Контролем служили случайные аминокислотные последовательности, генерированные из аминокислотного состава оригинальных белков программой RandSeq. Каждый модельный белок СК и его «случайный» аналог служили «удочками» (query) для поиска сходных белков в протеомах изучаемой группы эукариот. Показателем сходства служил параметр Score. В случае близких показателей сходства нативного и «случайного» белков сравнивали средние значения их Score по 10 лучшим результатам поиска. Сравнение проводили с помощью *t*-теста Стьюдента. Значения Score зависят от длины молекулы, поэтому сравнивать эти показатели для белков разной величины некорректно. Однако сравнение их «по вертикали», т. е. для разных групп эукариот, вполне уместно.

Белки латеральных элементов СК, несущие домен HORMA (Hop1, HIM-3, ASY1 и ASY2), имеют сходные белки (с таким же доменом) в протеомах многих эукариот. Домен HORMA структурирует хромосомы и рекрутит другие белки. Белки поперечных фибрill СК, обладающие сходной вторичной альфа-спиральной структурой (Zip1, C(3)G, SYP-1, ZYP1a и ZYP1b, SYCP1), за пределами своих таксонов имеют очень небольшое, но достоверное сходство с белками эукариот разной степени организации, что, видимо, обусловлено спецификой именно альфа-спиральных участков белка.

В некоторых группах эукариот мы не выявили белков, сколь-нибудь сходных с известными модельными белками СК, за исключением белка FKBP6 мыши — фермента пептидил-пролил-цис-транс-изомеразы. Для большинства таксонов негативный результат может объясняться малым количеством аннотированных белков в базах данных. Однако у бурых водорослей, динофлагеллят, хрящевых рыб, ризарий и кольчатых червей аннотировано достаточное количество белков, поэтому отсутствие у них белков, сходных с известными белками СК, можно объяснить либо формированием у них СК из неизвестных пока белков, либо отсутствием СК в мейозе у этих видов, что иногда подтверждается цитологически.

Наши исследования подтверждают гипотезу о том, что в каждой из самостоятельно развивавшихся эволюционных линий многоклеточных эукариот (красные и бурые водоросли, зеленые водоросли и растения, грибы, животные) имеется общий набор базовых мейотических белков, но, кроме этого, есть специфичный для каждой линии набор структурных белков, в том числе белков синаптонемного комплекса.

РАЗНООБРАЗИЕ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ЯДЕР У ВИДОВ РОДА PELOMYXA (АМОЕВОЗОА, AR-СНАМОЕВАЕ, PELOMYXIDAE). © А. В. Гудков,¹ М. А. Бердиева,² Л. В. Чистякова,² Д. С. Боголюбов.¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, pelgood1@gmail.com, и ²С.-Петербургский государственный университет.

Представители рода *Pelomyxa* — это свободноживущие анаэробные или микроаэробные эукариотные микроорганизмы с амебоидным типом клеточной организации, обладающие в большинстве случаев несколькими или многочисленными неподвижными или малоподвижными жгутиками, не участвующими в клеточной локомоции; в жизненном цикле пеломикс, как правило, имеется многоядерная стадия. В настоящее время известно 11 видов пеломикс — *P. palustris*, *P. prima*, *P. belevskii*, *P. tertia*, *P. binucleata*, *P. paradoxa*, *P. corona*, *P. stagnalis*, *P. gruberi*, *P. flava* и *P. secunda*.

Удивительной и уникальной среди протистов особенностью представителей рода *Pelomyxa* являются чрезвычайное разнообразие и сугубая видоспецифичность организации их ядер. Согласно традиционной классификации Райкова (1982), у пеломикс встречаются ядра как «овулярного», так и «везикулярного» типов. «Овулярные» ядра характерны для видов *P. palustris*, *P. belevskii*, *P. secunda* и *P. flava*, «везикулярные» свойственны *P. stagnalis*, *P. prima* и *P. gruberi*. Однако ядра остальных видов не могут быть однозначно классифицированы в соответствии с данной классификацией, поэтому мы условно выделяем среди них «нетипичные везикулярные» (*P. binucleata*) и «нетипичные овулярные» (*P. corona*, *P. paradoxa* и *P. tertia*). При этом даже в тех случаях, когда ядра относятся к одному и тому же типу, они весьма существенно различаются в деталях своего строения. Внутриядерные образования в клетках пеломикс морфологически в большинстве случаев выглядят очень необычно и с трудом могут быть отнесены к какому-либо конкретному из известных типов ядерных субкомпартментов. У *P. stagnalis* и *P. paradoxa* в составе ядрышек обнаруживаются небольшие морфологически четко дифференцированные тельца с характерной структурной организацией, которые получили специальное название гломерулосомы (от лат. glomerato — скручивать в клубок). Понятно, что без проведения специальных цито- и иммуноцитохимических тестов точно определить природу этих и других внутриядерных образований не представляется возможным.

Не менее разнообразны и специфичны структурные усложнения наружной поверхности ядерной оболочки у видов пеломикс, обладающих ядрами «овулярного» типа. Так, поверх наружной ядерной мембранны могут располагаться дополнительные слои — производные каналов и пузырьков эндоплазматического ретикулума; это может быть один или несколько слоев коротких микротрубочек, лежащих параллельно друг другу и поверхности ядра; это могут быть небольшие везикулы с электронно-плотным содержимым, располагающиеся непосредственно в окольядерном пространстве, и т. д.

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ ХРОМОСОМНОГО АППАРАТА У АГАМНЫХ СВОБОДНОЖИВУЩИХ АМЕБ ТИПА АМОЕВА PROTEUS. © А. В. Гудков, С. Ю. Демин, А. Л. Юдин, Ю. И. Подлипаева. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, pelgood1@gmail.com

Свободноживущие амебы типа *Amoeba proteus* уже более двух веков являются классическим модельным объектом клеточной биологии. В частности, они привлекают внимание исследователей как облигатно агамные эукариотные микроорганизмы. Однако современные исследования с использованием амеб во многом тормозятся вследствие недостаточной изученности их хромосомного

аппарата. Принято считать, что хромосомы *A. proteus* очень мелкие и их число достигает 500 или более (Yudin, 1990; Марахова и др., 1993), но эти данные носят лишь предположительный характер. Остается открытым вопрос и о степени полидности их ядра. Решение его затруднено из-за агамности амеб и слабо выраженной индивидуальности хромосом, хотя полиплоидность ядра этих организмов «неоднократно подозревалась» (Raikov, 1982). Клеточный цикл *A. proteus* имеет ряд особенностей, осложняющих использование определения содержания ДНК как меры полидности: в цикле отсутствует фаза G₁, а сразу по окончании кариокинеза начинается синтетическая фаза (S), причем если в момент окончания кариокинеза количество ДНК условно принять за единицу, то к началу фазы G₂ его количество в ядре может увеличиваться в 3.9 раза (так называемая гиперрепликация ДНК), однако в дальнейшем в ходе фазы G₂ часть ДНК элиминируется (Afon'kin, 1989; Махлин, 1993). Обилие эндоцитобионтных микроорганизмов в цитоплазме и содержащее пищеварительных вакуолей амеб приводят к необходимости выделения ядра из клетки для проведения корректных количественных измерений, что делает невозможным измерение содержания ДНК в ходе митоза методом цитофлуориметрии. Наконец, до сих пор неизвестно, различаются ли кариотипы у штаммов одного вида, но разного происхождения, что имеет принципиальное значение для анализа проблемы вида у этих облигатно агамных организмов, имеющих всесветное распространение.

Одной из традиционных проблем всех предыдущих работ с организмами типа *A. proteus* является получение адекватного для исследования количества делящихся клеток. Мы предлагаем для решения этого вопроса использовать новый, недавно разработанный нами высокоэффективный метод синхронизации клеточного цикла амеб в культуре путем их пиноцитарного кормления, приводящий к приблизительно 90%-ной синхронизации клеток по ядерному циклу в зависимости от штамма и условий проведения экспериментов (Podlipaeva et al., 2013). Для приготовления препаратов хромосом мы предлагаем использовать метод, недавно разработанный для клеток насекомых и получивший название a high-pressure squash technique (Sharakhova et al., 2011), который позволяет получать двухмерные спреды метафазных хромосом с высоким оптическим разрешением их тонкой структуры. Этот метод существенно модифицирован нами применительно к амебоидным организмам типа *A. proteus* и с успехом опробован на двух коллекционных штаммах этого вида (штаммы В и CONT). Уже первые предварительные данные, полученные нами в результате исследования, свидетельствуют об ошибочности традиционных представлений об организации хромосомного аппарата у этих низших эукариот.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ С Е3-УБИКВИТИНЛИГАЗОЙ PIRH2. © А. А. Дакс,¹

О. А. Федорова,^{1,2} П. Н. Курылко,¹ Н. А. Барлев.^{1,2} ¹С.-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), alexandra.daks@gmail.com, и

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Белок Pirh2 (RCHY1) является Е3-убиквитинлигазой, модифицирующей главный онкосупрессор клетки p53 и направляющей его на протеасомную деградацию. По-

вреждение ДНК приводит к активации p53 за счет фосфорилирования этого белка по сайту Ser15. Данная модификация препятствует взаимодействию p53 с его главным негативным регулятором — Mdm2, однако в отличие от Mdm2 Pirh2 способен модифицировать такую активированную форму p53 и направлять ее на деградацию. Таким образом, закономерно, что сверхэкспрессия Pirh2 наблюдается в клетках многих типов опухолей, например при раке простаты, раке легких и др. Мишениями Pirh2 являются и другие белки, участвующие в регуляции клеточного цикла, апоптоза и ответе на повреждение ДНК, например Cdk9, p27 и PolH, однако роль белка Pirh2 в данных процессах остается недостаточно изученной. Для того чтобы приблизиться к пониманию механизмов Pirh2-зависимой регуляции канцерогенеза, репарации ДНК и других важнейших клеточных процессов, с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии мы идентифицировали ядерные белки, взаимодействующие с Е3-убиквитинлигазой Pirh2.

С этой целью мы сконструировали вектор, кодирующий последовательность рекомбинантного белка Pirh-GST, индуцировали экспрессию данного вектора в клетках *E. coli* и выделили белок из бактериального лизата с помощью аффинной хроматографии на глутатион-сепарозе. После этого мы осуществили инкубацию Pirh2-GST с ядерными экстрактами, полученными из клеток H1299 рака легкого человека, обработанных и не обработанных противораковым препаратом доксорубицином для индукции клеточного ответа на повреждение ДНК. После разделения в полиакриламидном геле связавшиеся белки идентифицировали с помощью MALDI-TOF MS/MS масс-спектрометрии.

В результате анализа спектров пептидов было выявлено около 150 новых белков, взаимодействующих с Pirh2. Примечательно, что среди них идентифицировано несколько важнейших участников клеточного ответа на повреждение ДНК. Так, мы показали, что Е3-убиквитинлигаза Pirh2 напрямую взаимодействует с такими белками, как DDB1 (эксцизионная репарация), RAD18 (пострепликативная репарация), RAD21 (репарация двуцепочечных разрывов) и др. Мы также обнаружили, что Pirh2 связывается с белком Ku70 — субъединицей гетеродимерного комплекса Ku70—Ku80, осуществляющего репарацию двуцепочечных разрывов. Это взаимодействие мы подтвердили с помощью Вестерн-блота и последующей окраски антителами, специфичными к белку Ku70. На основе данных иммуноокрашивания можно сделать вывод о том, что после обработки клеток доксорубицином количество Ku70, связавшегося с Pirh2, меньше по сравнению с контролем без обработки. Это хорошо согласуется с данными об убиквитинзависимой деградации Ku70 в ответ на апоптотические стимулы. Известно, что деградация Ku70 позволяет апоптотическому белку Bax активировать митохондриальный путь клеточной смерти. Ранее было показано, что убиквитинлигаза Mdm2 модифицирует Ku70 с последующей протеасомной деградацией последнего. Мы предполагаем, что Е3-лигаза Pirh2 также способна убиквитинировать Ku70 в ответ на повреждения ДНК, таким образом влияя на регуляцию процесса клеточной смерти.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта правительства Российской Федерации № 11.G34.31.0069 от 21.10.2011 и Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 14-04-32242-мол_а и 13-04-01024-а).

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ЯДЕР ЦИСТНЫХ КЛЕТОК В СЕМЕННИКАХ МОЛЛЮСКА *LITTORINA SAXATILIS*. © С. Ю. Демин,¹ А. И. Гранович,² Н. А. Михайлова.^{1,2} ¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, serghei.demin@gmail.com, и ²Биологический факультет С.-Петербургского государственного университета.

По данным прижизненных наблюдений методом DIC, семенники морского переднежаберного моллюска *Littorina saxatilis* (Olivi, 1792) имеют лобулярно-цистную организацию, до настоящего времени не обнаруженную у других моллюсков, однако сходную с таковой у модельного объекта *Drosophila melanogaster*. Вместе с тем оформленной ниши гонады, в которой расположены стволовые клетки у дрозофилы, у моллюсков не обнаруживается. Как и у дрозофилы (http://flybase.org/static_pages/termlink/termlink.html), у литторины на этапе первичной дифференцировки стволовых клеток формируются гониобластные цисты, состоящие из клеток разного происхождения — первичного сперматогония, происходящего из стволовой клетки зародышевой линии, и цистной клетки соматического происхождения. На препаратах спредов ядер и хромосом, полученных методом высокого давления (250 кг/см²) и окрашенных ДНК-тропными флуорохромами DAPI и хромомицином A₃, а также азотнокислым серебром и красителем Гимза, такие цисты обнаруживаются в виде спаренных ядер диплоидных размеров. Судьба первичного сперматогония в гониобластных цистах моллюсков в отличие от таковой у дрозофилы строго не определена. Число формирующихся вторичных сперматогониев в ходе дальнейшей дифференцировки сперматоциты варьирует от 1 до 8, у *D. melanogaster* их всегда 16. Так же как и у дрозофилы, деления ядра цистной клетки в составе сперматоциты не происходит. Дифференцировка сперматоциты завершается вместе со спермиогенезом, по окончании которого оболочка цисты локально разрывается, так что созревающие спермии выходят в лобулярный каналец, затем в центральную полость гонады и далее — в семявыносящий проток.

Нами установлено, что свободная от спермиев циста не погибает. Формируя лобоподио, она способна к миграции и захвату свободных сперматогониев. Свободная цистная клетка может подвергаться дальнейшей дифференцировке путем эндоредупликации ядра. На аспермических мутантах *D. melanogaster*, в гонадах которых отсутствуют клетки зародышевой линии, показано, что цистные клетки способны к митотическим делениям, так что после миграции в полость гонады они формируют небольшие кластеры (Gonczy, DiNardo, 1996; Spradling et al., 2011). Нами показано, что число раундов эндоредупликации ядра цистной клетки литторины может варьировать от 1 до минимум 4—5 для моллюсков, обитающих в условиях Крайнего Севера (Белое, Баренцево и Норвежское моря). В популяциях моллюсков *L. saxatilis* Атлантического побережья Португалии частота эндоредуплицированных цистных клеток в гонаде и число раундов эндоредупликации ядра существенно ниже. Установлено, что механизм эндоредупликации представляет собой типичный эндомитоз с блоком сегрегации дочерних хромосом в эндо-анафазе. При самых высоких уровнях эндоредупликации в интерфазных ядрах цистных клеток могут формироваться помпоновидные политечные хромосомы.

Исследование проведено с использованием оборудования ресурсного центра «Развитие молекулярных и кле-

точных технологий» С.-Петербургского государственного университета и при финансовой поддержке программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 14-04-10195-к и 12-04-00312-а).

АХИАЗМАТИЧЕСКИЙ МЕЙОЗ У САМЦОВ МОРСКОГО МОЛЛЮСКА *LITTORINA SAXATILIS*. © С. Ю. Демин,¹ Н. А. Михайлова,^{1,2} В. Н. Стефанова,¹ А. И. Гранович.² ¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, serghei.demin@gmail.com, и ²Биологический факультет С.-Петербургского государственного университета.

У раздельнополых беспозвоночных с хромосомным типом определения пола особи гетерогаметного пола могут иметь атипичный ахиазматический мейоз (AM) (Кузнецова, Грозева, 2010). AM обнаружен у самцов пресноводных гастropод рода *Bithynia* (Debus, 1978), для морских моллюсков данный тип мейоза не установлен. Морской моллюск *Littorina saxatilis* имеет тип определения пола XY, при этом гетерогаметным полом являются самцы (Rolan-Alvarez et al., 1996). Отсутствие данных об организации семенников половозрелых моллюсков и протекании мейоза в созревающих сперматоцитах не позволяло определить тип мейоза.

В работе использованы методы прижизненных наблюдений семенников *L. saxatilis* на пределе оптического разрешения (DIC-микроскопия), а также техника спрединга ядер и хромосом с помощью высокого давления (250 кг/см²). Окрашивание AT-богатых участков хромосом проводили с использованием DAPI, GC-богатых участков — хромомицина A₃, для выявления ядрышек и Ag-NORs на хромосомах использовали метод окрашивания азотнокислым серебром (Howell, Black, 1979).

Показано, что сперматоциты *L. saxatilis* находятся в составе двухклеточных или многоклеточных цист, что характерно для лобулярно-цистного типа организации testicул, во многом сходного с типом организации семенников *Drosophila melanogaster*. В состав цисты входят одна цистная клетка, имеющая соматическое происхождение, и один или несколько сперматоцитов. На спредах мейоцитов при всех типах окрашивания в лептотене — ранней пахитене наблюдаются структуры периферического хроматина типа ламповых щеток. Прижизненные наблюдения зиготенных сперматоцитов и окрашивание DAPI выявляют короткие участки (зиги) конденсированного хроматина. К поздней пахитене происходит редукция структур типа ламповых щеток. Вместо классической хиазматической диплотены, характерной для мейоцитов самок *L. saxatilis*, у самцов наблюдается повторная агрегация хромосом бивалента в однонитевую структуру (compact stage). Как и у моллюсков рода *Bithynia*, хромосомные фигуры диакинеза *L. saxatilis* внешне напоминают картину хиазматического диакинеза, однако ультраструктурные исследования показали, что рекомбинационные пузырьки при AM затрагивают только материал периферических петель хроматина, а не осевых структур хромосом (Debus, 1978). В сперматоцитах *L. saxatilis* в метафазе I обнаружаются 3 стадии — агрегации унивалентов в биваленте, продольного расщепления бивалентов и их сегрегации. В интервале лептотена — compact stage AM у сперматоцитов I порядка выявляются 1—2 компактных ядрышка, в интерфазных ядрах сперматоцитов II порядка — от 4 до 6. В ядрах первичных сперматид

число ядрышек уменьшается до 1—4, в профазе 2-го деления мейоза ядрышки не выявляются. Ag-NORs не выявляются ни на одной из стадий мейоза. Обсуждаются роль АМ в снижении уровня генетической рекомбинации у самцов *L. saxatilis* и эволюционное значение АМ при формировании комплексов криптических видов моллюсков.

Исследование проведено с использованием оборудования ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» С.-Петербургского государственного университета и при финансовой поддержке программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 14-04-10195-к и 12-04-00312-а).

ПРИМЕНЕНИЕ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ ЭНДОМЕТРИЯ КРЫС. © А. П. Домнина, В. М. Михайлов, Н. Н. Никольский. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, al-domnina@mail.ru

При наступлении беременности клетки стромы функционального слоя эндометрия под воздействием гормонов желтого тела превращаются в децидуальные клетки и участвуют в имплантации эмбриона и в формировании плаценты. Повреждение или недостаточное развитие функционального слоя эндометрия приводит к возникновению спаек (синехий) и бесплодию.

На сегодняшний день единственным способом лечения внутриматочных синехий является оперативный метод с последующей циклической гормонотерапией в течение 3—6 мес. Однако имеются данные по успешному применению аутологичных клеток костного мозга для лечения наиболее тяжелой формы данного заболевания — синдрома Ашермана (Nagori et al., 2011; Zhao et al., 2013).

В последние годы появилось значительное число публикаций о выделении и использовании стволовых клеток эндометрия (Chan et al., 2004; Cho et al., 2004; Gargett, 2006).

Нами были получены и охарактеризованы линии мезенхимных стволовых клеток из десквамиированного эндометрия, содержащегося в менструальной крови человека (эМСК) (Земелько и др., 2011). Клетки этих линий обладают всеми свойствами, присущими мезенхимным стволовым клеткам: самообновлением, экспрессией специфических маркеров и мультипотентностью. эМСК имеют позитивную экспрессию таких маркеров, как CD73, CD90 и CD105, а также CD13, CD29 и CD44. Отсутствие экспрессии поверхностных маркеров CD19, CD34, CD45, CD117, CD130 и HLA-DR (класса II) характеризует клетки выделенных линий как имеющие мезенхимный стромальный, а не гемопоэтический фенотип. Мультипотентность выделенных эМСК подтверждена их способностью дифференцироваться в другие типы клеток мезодермы, такие как остеобlastы и адипоциты. Пролиферативная активность эМСК в культуре оценивается как высокая, время удвоения в среднем составляет 23—24 ч. Простой и неинвазивный для донора способ получения, активная пролиферация и мультипотентность делают эти клетки перспективным субстратом для клеточной терапии.

Терапевтические свойства эМСК *in vivo* мы изучали на модели псевдобеременности у крыс. Было обнаружено, что трансплантация эМСК в матку псевдобеременным

крысам стимулирует развитие децидуальной ткани. Гистологический анализ показал, что трансплантация эМСК ведет к увеличению размера децидуа за счет более интенсивного развития и пролиферации всех тканевых элементов. Для подтверждения стимулирующих свойств эМСК, а не их ксеногенного для крыс статуса проводили эксперименты с использованием клеток костного мозга (ККМ) крысы в аналогичной модели. Было обнаружено, что трансплантация ККМ крысы оказывает такой же эффект, как и трансплантация эМСК человека.

Таким образом, полученные данные открывают дальнейшие перспективы для детального изучения влияния эМСК на функциональное состояние эндометрия и возможность применения эМСК для лечения форм бесплодия, связанного с недостаточным развитием эндометрия.

СПЛАЙСИНГ-ФАКТОРЫ КАК ПОЗИЦИОННЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА В ТКАНЯХ ДРОЗОФИЛЫ. © Т. Д. Дубатолова, С. А. Копыл, Л. В. Омельянчук. Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, ome@mcb.nsc.ru

Поиск генов митоза с помощью РНКи-подхода в клеточных культурах показал, что среди идентифицированных 142 генов митоза 17 являются сплайсинг-факторами (Somma et al., 2008). Ряд полногеномных исследований продемонстрировал, что сплайсинг-факторы дрозофилы вовлечены также и в контроль клеточного цикла (Kondo, Perrimon, 2011; Neumuller et al., 2011). В частности, по данным этих работ, инактивация сплайсинг-фактора SF2 вызывает увеличение длительности фазы G₂ клеточного цикла в культуре клеток.

Мы исследовали, каким образом инактивация SF2 влияет на клеточный цикл в крыловом и глазном имагинальных дисках дрозофилы, с помощью проточной цитометрии и анализа динамики роста мозаичных клонов. Проточная цитометрия позволяет определить соотношение стадий клеточного цикла, а клональный анализ — его общую длительность. Совокупность этих экспериментов позволила нам определить физическую длительность отдельных стадий клеточного цикла (контроль: G₁ = 2.25 ч, G₂(M) = 4.86, S = 1.28 ч; опыт: G₁ = 1.89 ч, G₂(M) = 7.22, S = 1.30 ч) и показала, что в тканях эффект такой же, как и в клеточной культуре (Dubatolova et al., 2013).

Проведенный нами анализ дисперсии мозаичных клонов по размерам продемонстрировал, что дисперсия больше в случае инактивации SF2. Это свидетельствует в пользу того, что эффект инактивации в имагинальном диске носит не общий, а региональный характер. Для проверки гипотезы о региональном характере влияния сплайсинг-факторов на клеточный цикл мы исследовали паттерн экспрессии другого сплайсинг-фактора (CG13298) с помощью белковой ловушки (инактивация этого гена в клеточной культуре, по данным ряда авторов (Goshima et al., 2007), вызывает аномалии веретена деления). В крыловом и ножном имагинальных дисках был обнаружен крайне рельефный паттерн экспрессии. Это свидетельствует о правильности наших предположений об участии сплайсинг-факторов в позиционном контроле длительности фаз клеточного цикла на уровне ткани.

ФИЗИОЛОГИЯ ТЕЛОМЕР БУРОЗУБКИ ИБЕРИЙСКОЙ *SOREX GRANARIUS*. © Н. С. Жданова,¹ Ю. М. Минина,¹

И. Драсковик,² Т. В. Карамышева,¹ К. Ново,² В. Ли,² М. Э. Зверева,³ Д. А. Скворцов,³ Н. Б. Рубцов,¹ А. Лондоно.² ¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия, ²Институт Кюри, Париж, Франция, и ³Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Россия, zhdanova@bionet.nsc.ru

Теломеры представляют собой нуклеопротеиновые структуры, кэпирующие концы хромосом и предотвращающие их слияния. Теломеры содержат повторяющиеся последовательности ТТАГГГ на отстающей в ходе репликации нити ДНК и белковый защитный комплекс shelterin, который среди прочих функций осуществляет взаимодействие однонитчатого Г-обогащенного конца теломеры с двунитчатыми теломерными повторами. Длина теломер является важным функциональным показателем. У человека и диких видов млекопитающих она, как правило, не превышает нескольких десятков т. п. н. и поддерживается с помощью фермента теломеразы. Но в 10—15 % опухолей человека длина теломер поддерживается с помощью механизма ALT (Alternative Telomere Lengthening), основанного на гомологичной рекомбинации. Один из видов буровзубок, *Sorex granarius*, характеризуется теломерами необычной 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 прерывистые с включениями рДНК, либо блоки рДНК прилегают к теломерам. На остальных концах хромосом локализованы короткие теломеры размером 3.8 т. п. н. Однако теломеры вида-близнеца *S. araneus* схожи с теломерами человека. Таким образом, даже близкородственные виды, кариотипы которых составлены практически из идентичных хромосомных плеч, могут различаться по структуре терминальных районов. По-видимому, необычная структура теломер *S. granarius* стала причиной того, что в отличие от других видов млекопитающих теломерный транскриптом *S. granarius* содержит как Ц-, так и Г-обогащенные молекулы РНК. Изучение физиологии длинных теломер показало, что поддержание их длины в первичных фибробластах осуществляется 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 перевиваемых наблюдалось некоторое повышение активности теломеразы, но не было признаков кризиса клеточного роста и появления крупных структурных хромосомных перестройек. Возможно, что трансформация этих клеток сопровождается не ингибированием—активацией теломеразы, а просто повышением ее активности. Кроме того, в первичных фибробlastах *S. granarius* мы обнаружили некоторые признаки ALT-активности, указывающие на участие рекомбинационных процессов в определении длины теломер этого вида, в том числе пострепликационные сестринские обмены в длинных теломерах и наличие кольцевой теломерной ДНК. Также в них были выявлены APBs-тельца и колоколизация с ними Rap1 shelterin. Эти данные и данные по 3D-анализу числа теломер свидетельствуют о физической возможности образования междухромосомных теломерных обменов. Кроме того, в клетках этого вида мы наблюдали высокое число дисфункциональных длинных и коротких теломер (32 на метафазу), из них значительная часть была спонтанными, в то время как в диплоидных клетках человека и, как мы показали, *S. araneus* и крыс, число дисфункциональных теломер не

превышает 5 на метафазу. Тем не менее все теломеры *S. granarius* выполняют функцию защиты концов хромосом. Таким образом, длина теломер в диплоидных клетках *S. granarius* определяется балансом активности теломеразы и интенсивностью гомологичной рекомбинации.

Работа выполнена при финансовой поддержке бюджетного проекта Института цитологии и генетики СО РАН VI.45.1.6. «Молекулярная и функциональная организация и эволюция эукариотических хромосом» и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-00157).

ДИНАМИКА РОСТА ЯДЕРНОЙ ОБОЛОЧКИ.

© О. А. Жиронина,^{1,2} В. Д. Черепанинцев,^{1,2} О. С. Стрелкова,^{2,3} С. Ю. Курчацова,² И. И. Киреев.^{1,2} ¹Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, temchromatinlab@gmail.com,

²Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова и ³Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

Ядерная оболочка — многокомпонентная внутриклеточная структура, основными функциями которой являются обеспечение тонкорегулируемого барьера между ядерным и цитоплазматическим компартментами, обеспечение механической прочности ядра и эпигенетическая регуляция хроматина за счет его заякоривания на периферии. Рост ядерной оболочки на протяжении клеточного цикла — необходимое условие поддержания постоянства ядерно-цитоплазматического соотношения в ряду клеточных делений. При этом потребность в новосинтезированной ядерной оболочке неодинакова на протяжении клеточного цикла: репликация периферического хроматина во второй половине S-фазы может вызывать необходимость в дополнительных посадочных местах для гетерохроматина. Кроме того, синтез ламина B1 начинается только в S-фазе.

Для выяснения динамики роста ядерной оболочки был произведен высокопроизводительный флуоресцентный микроскопический скрининг клеточной популяции культуры 3T3. Автоматизированный статистический анализ клеток по трем параметрам (площадь ядра, количество ДНК и репликативный статус клетки) позволил показать, что скорость роста ядра не различается на стадиях G₁, S и G₂. Длительный (более 24 ч) прижизненный индивидуальный анализ клеток культуры СПЭВ, экспрессирующих ламин A-GFP, также показал равномерный рост ядерной оболочки между двумя митозами. Таким образом, ядерная оболочка растет равномерно на протяжении интерфазы, несмотря на отсутствие синтеза ламина B1 в фазе G₁. Дефицит ламинов B1 в фазе G₁ может компенсироваться за счет смены механизмов роста: рост растяжением в фазе G₁ и рост встраиванием начиная с S-фазы либо за счет запасания ламинов B1 в предыдущем клеточном цикле.

Для выяснения механизма роста ядерной оболочки была измерена скорость восстановления флуоресценции клеток культуры HT1080, экспрессирующих ламин B1-GFP и PCNA-RFP. Статистически значимой разницы между популяциями, находящимися в S-фазе и вне ее, выявлено не было, что свидетельствует о едином ме-

низме роста ядерной оболочки на протяжении интерфазы. Несмотря на низкую скорость восстановления флуоресценции, которая в среднем составила $3.25 \pm 2.47\%$, ее достаточно для удвоения ядерной оболочки.

Вестерн-блот-анализ синхронной популяции клеток СНО показал, что в G₂-фазе происходит накопление ламина B1 в неполимеризованной фракции. Таким образом, компенсация дефицита ламина B1 в фазе G₁ происходит за счет запасания ламина B1 в неполимеризованном состоянии на протяжении предыдущего клеточного цикла, что позволяет беспрепятственно равномерно наращивать площадь ядерной оболочки на протяжении всей интерфазы.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-00885).

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ХРОМАТИНА ЭУКАРИОТ: КОМПАКТНОСТЬ ИЛИ АКТИВНОСТЬ?
 © O. A. Жиронкина,^{1,2} В. Д. Черепанинец,^{1,2} О. С. Стрелкова,³ Ш. Денг,⁴ А. Бельмонт,⁴ И. И. Киреев.^{1,2} ¹Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, temchromatinlab@gmail.com, ²Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, ³Факультет биоинформатики и биоинженерии Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова и ⁴Отделение клеточной биологии и биологии развития, Университет штата Иллинойс, Урбана-Шампейн, США.

Пространственная организация генетического материала клеток эукариот осуществляется путем многоуровневой упаковки ДНК в комплексе с белками (хроматина). Способ упаковки хроматина четко коррелирует с функциональным состоянием находящихся в нем участков генома и может являться дополнительным механизмом эпигенетической регуляции генной активности, а также оказывать существенное влияние на другие клеточные процессы с участием ДНК (репликацию, репарацию и сегрегацию). Традиционно считается, что активно транскрибирующиеся гены ассоциированы с сильно деконденсированным хроматином (эухроматином), имеющим конформацию нуклеосомных фибрилл. Ранее мы показали, что искусственные хромосомные локусы демонстрируют транскриptionную активность без значительной деконденсации хроматина. В настоящей работе мы исследовали способ укладки ДНК в составе транскрикционно активного эухроматина, используя недеструктивные методы мечения различных функциональных участков генома на основе времени их репликации. Применение методов флуоресцентной микроскопии с суперразрешением (микроскопия со структурированным освещением и локализационная микроскопия) в сочетании с иммуноэлектронной микроскопией показало, что ранореплицирующийся эухроматин подобно гетерохроматину организован в виде фибрилл высшего порядка — хромонем диаметром до 200 нм. Сравнительный анализ линейных параметров этих фибрилл в фиксированных и живых клетках позволяет исключить артефактность наблюдаемых структур. Более того, анализ динамики структурных преобразований хроматина в процессе и по завершении репликации указывает на то, что и процесс синтеза ДНК не требует

глобальной декомпактизации ДНК. Полученные данные подтверждают ранее высказанное предположение о возможности осуществления синтетических процессов на высокоструктурированной хроматиновой матрице и заставляют пересмотреть традиционные взгляды на структурную организацию хроматина.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-00885).

ВЛИЯНИЕ СТРЕССА НА РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТЕАСОМ В КЛЕТКЕ. © Ю. Я. Зайкова, А. С. Цимоха. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, vat-julia@yandex.ru

Убиквитин-протеасомная система осуществляет программированный протеолиз и процессинг различных регуляторных белков, участвующих во множестве клеточных процессов, включая регуляцию транскрипции, репарацию ДНК, продвижение клетки по клеточному циклу, иммунный ответ и апоптоз. 26S протеасома, состоящая из протеолитической коровой частицы (20S протеасомы) и одного или двух 19S регуляторов, является протеолитическим «ядром» этой системы.

Согласно современным представлениям, протеасомы присутствуют в цитоплазме и в ядрах всех эукариотических клеток. Однако картина распределения протеасом между ядром и цитоплазмой сильно различается в зависимости от типа клеток и от физиологического состояния самих клеток. Известно, что при дифференцировке или в ответ на кислородное и глюкозное голодание протеасомы накапливаются в ядре клеток. Полагают, что внутриклеточное распределение протеасом определяется их протеолитической функцией, что подтверждается также присутствием и других компонент убиквитин-протеасомной системы. Возникает вопрос: как распределяются протеасомы в клетке в ответ на действие ДНК-повреждающих агентов или при окислительном стрессе?

На сегодняшний день существует несколько широко используемых в биолого-медицинских исследованиях ДНК-повреждающих агентов — доксорубицин, цисплатин и этопозид. Окислительный стресс чаще всего вызывает воздействием на клетки пероксида водорода. В настоящем исследовании влияния генотоксического и окислительного стрессов в клетках на внутриклеточное распределение протеасом мы использовали клетки линии HeLa, стабильно экспрессирующие протеасомный белок PSMB4, слитый с зеленым флуоресцентным белком EGFP. Распределение клеток по клеточному циклу и динамику апоптоза в клетках оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии. Локализацию протеасом визуализировали с помощью приживленной флуоресцентной микроскопии, ядра окрашивали красителем Hoechst 33258. Мы показали, что при индукции стресса в клетках наблюдается внутриклеточное перераспределение протеасом. Интересно, что при увеличении концентрации ДНК-повреждающих агентов и времени их воздействия на клетки наблюдается рекрутирование протеасом из цитоплазмы в ядра клеток. Первоначально наблюдается накопление протеасом в области ядерной мембранны, а затем происходит транспорт протеасом в ядро при развитии апоптоза в клетках, что неудивительно в силу ключевой роли убиквитин-протеасомной системы в регу-

ляции ДНК-репарации и апоптозе. Данные прижизненной флуоресцентной микроскопии мы подтвердили при помощи иммуноанализа протеасомных белков в отдельных клеточных фракциях (цитоплазме, нуклеоплазме и белках хроматина). Таким образом, наши данные показывают, что количество ядерных протеасом возрастает в ответ на действие ДНК-повреждающих агентов, и свидетельствуют в пользу участия протеасом в регулируемом протеолизе в ядрах клеток в ответ на генотоксический стресс.

ДЕКОНДЕНСАЦИЯ ЯДЕРНОГО ХРОМАТИНА ЗРЕЛЫХ СПЕРМАТОЗОИДОВ МЫШЕЙ-ГИБРИДОВ СВА/С57В16 И МЫШЕЙ ЛИНИИ 129/IMG, МУТАНТНЫХ ПО ГЕНУ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ЙОТА, ПОДВЕРГШИХСЯ ВЛИЯНИЮ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА IN VITRO. © С. Т. Захидов,¹ Т. Л. Маршак,² Л. Е. Андреева,³ В. М. Рудой,⁴ О. В. Дементьева,⁴ Н. М. Муджиши,^{1,2} С. М. Павлюченкова,^{1,2} И. В. Макарова.³ ¹Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, ²Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва. 4361.idb@bk.ru, ³Институт молекулярной генетики РАН и ⁴Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва.

Модельная система деконденсации ядерного хроматина в зрелых сперматозоидах млекопитающих *in vitro*, основанная на использовании натрий додецилсульфата (НДС) и тиолового реагента дитиотреитола (ДТТ), имитирует процесс формирования мужского пронуклеуса и может быть использована для выявления скрытых нарушений в структуре гаметического ДНП-комплекса, в том числе и после воздействия разнообразных факторов. В настоящей работе с применением данной модельной системы в сравнительном плане изучены особенности изменений хроматина в нативных эпидидимальных спермиях мышей F1 гибридов и мутантных по гену ДНК-полимеразы йота мышей линии 129/IMG в ответ на действие наночастиц золота размером 2—3 нм, в концентрации $1 \cdot 10^{15}$ частиц/мл. Приготовление контрольных и опытных образцов семени, а также цитологических препаратов, их фиксацию и окрашивание проводили по ранее описанным методикам (Захидов и др., 2010).

Светооптические наблюдения показали, что после 30 мин инкубации сперматозоидов в физиологическом растворе (контроль) или гидрозоле наночастиц золота (опыт) при 23 °C и последующей обработки в растворе, содержащем ДТТ, в течение 1 ч в популяции гамет обнаруживались клетки, различающиеся по степени деконденсации хроматина. Условно они были разделены на три основные группы — недеконденсированные, частично и полностью деконденсированные. При этом у мышей линии 129/IMG в популяции «озолоченных» сперматозоидов в отличие от контроля было обнаружено сравнительно большое число клеток с разнообразными аномалиями ядерных форм. Подсчеты показали, что у мышей СВА/С57В16 частоты встречаемости недеконденсированных, частично и полностью деконденсированных ядер в контроле и опыте составили 2 : 8 : 90 и 30 : 33 : 37 % соответственно. У мышей линии 129/IMG в контроле и опыте выход клеток с недеконденсированными, частично и полностью деконденсированными ядрами оказался равным соответственно 0 : 13 : 87 и 8 : 27 : 65 %.

Итак, в последствиях влияния наночастиц золота на ДНП-комплекс нативных эпидидимальных сперматозоидов мышей-гибридов СВА/С57В16 и мышей линии 129/IMG, мутантных по гену ДНК-полимеразы йота, существует общая закономерность: при выбранных условиях эксперимента в обоих случаях после инкубации в золе с наночастицами золота наблюдалось уменьшение числа клеток с полностью деконденсированным ядерным хроматином. Для популяции зрелых гамет мышей линии 129/IMG этот «эффект уменьшения» оказался более слабым, чем для спермиев мышей-гибридов СВА/С57В16. Следовательно, сравнительный анализ указывает на существование каких-то тонких различий в упаковке ДНП-комплекса в гаметах самцов мышей-гибридов СВА/С57В16 и мутантных мышей линии 129/IMG.

В работе обсуждаются возможные молекулярно-генетические основы различий в упаковке ДНП-комплекса зрелых гамет сравниваемых линий мышей, а также механизмы взаимодействия нанокорпускул золота с ядерными структурами половых клеток эукариотических организмов.

МИКРОДИССЕКЦИЯ ГИГАНТСКИХ ХРОМОСОМ ИЗ РАСТУЩИХ ООЦИТОВ КУРИЦЫ КАК ПОДХОД К ПОЛУЧЕНИЮ ВЫСОКОСПЕЦИФИЧНЫХ ДНК-ЗОНДОВ. © А. М. Злотина,¹ Н. Косякова,² Т. В. Куликова,¹ Т. Лир,² А. В. Красикова.¹ ¹С.-Петербургский государственный университет и ² Институт генетики человека, Университет Йены, Германия, alla.krasikova@gmail.com

В последнее время для детального исследования хромосом и их отдельных районов стали широко применять метод микродиссекции. С использованием микродиссекции можно получать широкие панели цельнохромосомных и локус-специфичных зондов, маркирующих хромосомные районы любой протяженности и сложности организации (в том числе районы высокоповторяющихся последовательностей ДНК). Наиболее часто такие зонды используют для детального картирования границ эволюционных и клинически значимых хромосомных перестроек и для выявления ортологических районов хромосом в кариотипах разных таксономических групп организмов. Наряду с преимуществами метод микродиссекции хромосом имеет ряд ограничений. Так, в большинстве случаев для микродиссекции используют митотические, т. е. высококомпактизованные, хромосомы, при этом изолирование участков, не превышающих по размеру один G-бэнд, практически невозможно. Кроме того, для успешной амплификации полученного материала ДНК, а также специфичной и яркой гибридизации обычно требуется несколько (не менее 10—15) диссектированных копий хромосомного участка, что зачастую недостижимо в связи с дефицитом исходного материала.

В настоящей работе впервые был разработан подход к получению высокоспецифичных цельнохромосомных и локус-специфичных зондов для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с использованием микродиссекции гигантских хромосом типа ламповых щеток (ЛЩ). Для хромосом типа ЛЩ характерны хромомеро-петлевая организация и наличие различных маркерных структур, в том числе так называемых сложных петель. Кроме того, в среднем хромосомы типа ЛЩ птиц в 20—30 раз длиннее соответствующих метафазных хромосом, что значительно упрощает процедуру микродиссекции.

Диссекцию хромосом типа ЛЩ из растущих ооцитов домашней курицы *Gallus gallus domesticus* выполняли при помощи специальных стеклянных игл и инвертированного микроскопа, оснащенного микроманипулятором. Диссектированный материал амплифицировали методом ПЦР с вырожденными праймерами с использованием ДНК-полимеразы Sequenase T7. После этого полученные продукты метили гаптеном и использовали в качестве молекулярных зондов для проведения FISH. Важно подчеркнуть, что для получения каждого из зондов оказалось достаточно материала лишь одного бивалента. Так, например, в работе были получены ДНК-зонды из материала единичного маркерного хромомера на хромосоме 1, из материала хромомера и отходящей от него латеральной петли на хромосоме 3, из материала маркерной структуры на хромосоме 2, а также цельнохромосомный зонд половой хромосомы W курицы. Специфичность и яркость сигналов гибридизации были проверены с помощью FISH на метафазных хромосомах, хромосомах типа ЛЩ и на соматических клетках курицы.

Использование диссектированного материала хромосом типа ЛЩ в качестве зондов для FISH, а также дальнейший анализ этого материала с помощью методов секвенирования следующего поколения могут служить перспективным инструментом для цитогенетических и цитологических исследований маркерных районов хромосом.

Работа выполнена при технической поддержке РЦ «Хромас», РЦ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» и МРЦ по направлению «Нанотехнологии» (Санкт-Петербургский государственный университет).

РОЛЬ ЭНДОРЕДУПЛИКАЦИИ В ОБРАЗОВАНИИ СИСТЕМЫ ЦИТОКЕРАТИНОВЫХ ФИЛАМЕНТОВ КАК КОМПОНЕНТА БАРЬЕРА НА ПОВЕРХНОСТИ ФЕТО-МАТЕРИНСКОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В ПЛАЦЕНТЕ КРЫСЫ. © Т. Г. Зыбина, Е. В. Зыбина, Г. И. Штейн. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Инвазия трофобласта, которая обеспечивает имплантацию эмбриона при плацентации у грызунов, включает в себя несколько этапов. В частности, вторичные ГКТ образуют непрерывный «фронт» инвазии, одновременно проходя серию циклов эндоредупликации до уровней пloidности 256—1024c (Зыбина, 1986; Zybyina, Zybyina, 2005), тем самым образуя барьер между материнской и фетальной частями плаценты. Под слоем вторичных ГКТ образуется соединительная зона (C3), содержащая пул относительно низкopolиплоидных (2c—64c) высокопролиферативных клеток трофобласта, последующая дифференцировка которых дает начало ряду функционально различных популяций клеток плаценты, в частности гликогеновым клеткам. Третичные ГКТ (интерстициальные и эндоваскулярные) в отличие от вторичных ГКТ глубоко мигрируют в аллогенные материнские ткани в виде единичных клеток или их небольших скоплений. Цель настоящей работы состоит в исследовании внутриклеточного распределения цитокератина в зависимости от способов инвазии функционально различных субтипов клеток трофобласта крысы, различающихся и способами умножения генома. Было проведено иммуноцитохимическое мечение срезов плаценты белых крыс антителами Cytoker-

tin pan; для локализации гликогеновых клеток проводили PAS-реакцию.

Для разных популяций клеток трофобласта была выявлена различная внутриклеточная локализация цитокератина. Наиболее интенсивное мечение наблюдалось в высокоэндополиплоидных вторичных ГКТ. Особенно интенсивно окрашенные тяжи цитокератиновых филаментов наблюдались на периферии цитоплазмы и в обширной системе цитоплазматических отростков, которыми вторичные ГКТ контактируют друг с другом. Таким образом, цитокератиновые филаменты образуют каркас непрерывного слоя вторичных ГКТ, служащего барьером между материнской и фетальной частями плаценты. Одновременно некоторые вторичные ГКТ пронизывают децидуальную ткань с помощью своих пальцевидных отростков, окружая их обширные скопления и, вероятно, вызывая их деградацию. Сходное распределение цитокератина наблюдалось в гигантских клетках трофоспонгиума соединительной зоны плаценты, которые выстилают лакуны с материнской кровью. Цитокератин был распределен по всей цитоплазме, но особенно интенсивное окрашивание наблюдалось на периферии клеток и их отростков, которыми эти клетки соединяются друг с другом, образуя непрерывную выстилку лакуны. При эндovаскулярной инвазии цитокератин-положительных клеток трофобласта часто наблюдалась связь последних со слоем вторичных ГКТ с помощью интенсивно окрашенных цитокератин-положительных цитоплазматических отростков. Пролиферирующие и дифференцирующиеся клетки трофобласта C3 (в частности, прегликогеновые и гликогеновые клетки трофобласта) характеризуются более слабым иммуноокрашиванием цитокератина, несколько более интенсивным в перинуклеарной зоне цитоплазмы. Полученные данные свидетельствуют о том, что система промежуточных цитокератиновых филаментов, по-видимому, обеспечивает непрерывность слоя вторичных ГКТ и выстилки материнских кровеносных лакун клетками трофоспонгиума. Благодаря эндоредупликации рост слоя вторичных ГКТ осуществляется без дезинтеграции промежуточных филаментов, составляющих его каркас.

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

МОДУЛИРОВАНИЕ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ FOXO ИНГИБИТОРАМИ HDAC В E1A+RAS-ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ. © М. В. Иготти, О. О. Гнедина, Е. А. Филиппова, С. Б. Светличкова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, marie.igotti@gmail.com

Исследование различных комбинаций совместного влияния генотоксических агентов и HDIs на внутриклеточное содержание ROS показало, что NaB увеличивает количество и пролонгирует существование индуцированных этопозидом или адриамицином внутриклеточных ROS. Полученные данные дают основание предположить роль HDIs в снижении эффективности механизмов инактивации ROS.

Клетки противодействуют неблагоприятным последствиям ROS, активируя ферментативные скавенджеры ROS и(или) гены reparации ДНК. Одним из возможных кандидатов, опосредующих индуцированное аккумули-

рование ROS, являются транскрипционные факторы семейства Foxo. Транскрипционные факторы семейства FRHD класса О — Foxo — вовлечены в регуляцию различных физиологических процессов, включая остановку клеточного цикла, апоптоз, репарацию ДНК, устойчивость к стрессорным воздействиям и метаболизм. Транскрипционные факторы семейства Foxo регулируют наряду прочих транскрипцию генов, продукты которых являются ферментами, защищающими клетки от постоянно образующихся высокотоксичных свободных радикалов кислорода и водорода. Среди них такие ферменты, как супероксиддисмутазы (MnSOD и SOD2), глутатионпероксидаза и каталаза (Burgering, 2008). Активность транскрипционных факторов Foxo регулируется посттрансляционными модификациями, такими как ацетилирование и фосфорилирование. Ацетилирование снижает трансактивирующие свойства Foxo, препятствуя сайт-специфическому связыванию с ДНК (Nemoto, Finkel, 2002; Lehtinen et al., 2006), и промотирует фосфорилирование Foxo, ведущее к его деградации (Daitoku et al., 2004). Поэтому было исследовано влияние использованных ингибиторов HDAC, индуцирующих накопление ROS, на транскрипционные факторы Foxo.

Данные ОТ-ПЦР показывают, что HDIs не влияют на транскрипцию генов, кодирующих Foxo. При этом транскрипция генов-мишеней Foxo по-разному изменяется при действии HDIs. Транскрипция *p27/Kip1*, *mdr1* и *ddb1* падает, тогда как транскрипция *p21/Waf1*, *gadd45*, *MnSOD*, *bim* и *timp-9* возрастает со временем действия HDIs. Данные иммунофлуоресцентной микроскопии, а также иммуноблотинга показали, что HDIs изменяют внутриклеточную локализацию Foxo, вызывая выход Foxo из ядра при продолжительном времени действия. Данные иммуноблотинга показывают накопление фосфорилированной формы белка Foxo3 с увеличением времени обработки NaB. Это соответствует полученным нами ранее данным об активации киназы PKB/Akt при действии HDIs в E1A+Ras трансформированных клетках.

Таким образом, нами получены данные о снижении активности транскрипционных факторов Foxo при действии HDIs в E1A+Ras трансформированных клетках. Это может быть причиной снижения активности систем инактивации ROS при действии HDIs.

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ МОЛОДЫХ СУБСЕМЕЙСТВ ALU Y И МЕТИЛИРОВАНИЯ ИХ ДНК В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА. © И. Н. Кабанов,¹ Л. И. Тищенко.^{1,1} Кафедра биохимии биологического факультета С.-Петербургского государственного университета, Ink5@yandex.ru

Alu-повторы — наиболее изученные представители мобильных генетических элементов класса SINE (short interspersed elements — короткие диспергированные элементы) в геноме человека. SINE считаются РНК-полимеразой III, а затем их РНК может служить матрицей для обратной транскриптазы, которая закодирована в последовательностях длинных диспергированных повторов LINE. В настоящее время есть основания полагать, что Alu-последовательности и их транскрипты 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 повторов AluY, уровнем метилирования их ДНК и физиологическим статусом клетки (стадии пролиферации и апоптоза). Объектом исследования служили клетки гистиоцитарной лимфомы U937 и эритромиелобластоидной лейкемии человека K562 на этих стадиях. Апоптоз, вызванный ингибитором топоизомеразы I, камптометионом (CAM), был детектирован по появлению лестничной фрагментации ДНК через 24 и 48 ч обработки.

Методом количественной ОТ-ПЦР в реальном времени получены данные об экспрессии AluYb8 и других молодых субсемейств AluY (AluYa5-, Ya4-, Ya8-, Yc1-, Yg6- и Yb8-РНК) в клетках U937 и K562, находящихся в состоянии пролиферации и апоптоза. Уровень экспрессии генов молодых субсемейств Alu оценивали по содержанию соответствующих РНК в totalной РНК клеток. Было показано, что при апоптозе, индуцированном CAM, содержание Alu-РНК в клетках U937 возрастает в 2—3 раза, а в клетках K562 — в 4—6 раз после 24 и 48 ч обработки CAM по сравнению с пролиферирующими клетками.

При проведении ПЦР в реальном времени с праймерами, комплементарными к метилированным и неметилированным вариантам последовательности AluYb8, было показано, что паттерн метилирования Alu-ДНК не зависит от физиологического состояния клеток U937 (использовались праймеры, не затрагивающие промотор и 5'-фланкирующую зону гена AluYb8). Различными методами (метил-специфическая ПЦР (МС-ПЦР) с праймерами, комплементарными к метилированному и неметилированному вариантам В-бокса промотора гена AluYb8, HRM (High-Resolution Melting, плавление с высоким разрешением), а также секвенированием после бисульфитной обработки) были получены данные о характере метилирования ДНК AluYb8 на поздних стадиях апоптоза клеток K562. Так, методом МС-ПЦР было выявлено слабо выраженное уменьшение уровня метилирования CpG-сайта, расположенного в В-боксе промотора гена AluYb8, на поздних стадиях апоптоза по сравнению с пролиферирующими клетками. Кроме того, наблюдалось незначительное изменение общего уровня метилирования Alu-ДНК после 24 и 48 ч обработки по сравнению с пролиферирующими клетками (метод HRM). Наконец, методом секвенирования после бисульфитной обработки были выявлены разнонаправленные изменения метилирования различных CpG-сайтов в последовательности ДНК AluYb8 на поздних стадиях апоптоза по сравнению с пролиферирующими клетками.

ОСОБЕННОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ СИСТЕМЫ СВЕРТЫВАЕМОСТИ КРОВИ ПРИ ТРОМБОФИЛИИ. © А. М. Калимагамбетов,¹ С. А. Бектемисова,¹ Н. К. Дегемерзанова,² Т. С. Киселева,² А. Х. Ерденова.^{2,1} Казахский национальный университет им. аль-Фараби, aitkali.kalimagambetov@kaznu.kz, и ² Молекулярно-генетическая лаборатория ТОО «Tree Gene», Алматы, Казахстан.

В настоящее время проблема профилактики и раннего прогнозирования заболеваний с наследственной предрасположенностью системы гемостаза, в частности тромбофилии, патологического состояния, характеризующегося нарушением системы свертываемости крови, при которой увеличивается риск развития тромбоза, безусловно является актуальной (Heit, 2007).

Состояние тромбофилии объединяет все наследственные и приобретенные нарушения гемостаза, которым свойственна предрасположенность к раннему появлению и рецидивированию тромбозов, тромбоэмболий, ишемий и инфарктов органов. Факторами риска являются злокачественные опухоли, ожирение, сахарный диабет, сердечная недостаточность, беременность и т. д. (Баркаган, 2005).

В ранней диагностике и профилактике тромбофилии одним из этапов является выявление носительства полиморфных генов системы свертываемости крови. При этом практический интерес представляют наиболее распространенные в популяции следующие наследственные тромбофилические состояния: мутации гена *MTHFR C677T* (фермента, играющего ключевую роль в метаболизме фолиевой кислоты), гена фактора V свертывания крови *FV (Leiden)*, гена фолатного цикла *MTR* и гена протромбина *FII G20210A*, полиморфизм гена *ITGA2*, кодирующего аминокислотную последовательность α 2-субъединицы интегринов — специализированных рецепторов тромбоцитов. Следует отметить, что все перечисленные мутации относятся к генному полиморфизму, который заключается в альтернативных вариантах гена (нормальный или мутантный).

Целью данной работы явилось изучение полиморфизма пяти генов системы свертываемости крови — *MTHFR C677T, FV (Leiden), FII G20210A, MTR* и *ITGA2*.

Материалом для исследования послужила венозная кровь 115 человек с наличием фактора риска на тромбофилию. ПЦР-анализ осуществляли на амплификаторе ДНК ABI 9700 (Gold Applied Biosystems, США) с последующим документированием на системе гель-документирования GelDocXR.

Результаты исследования показали носительство и наследственную предрасположенность к заболеваниям системы свертываемости крови по пяти генам-маркерам в следующем соотношении: мутация гена *MTHFR C677T* — 42.27 % носителей в гетерозиготном состоянии (C/T) и мутантный вариант полиморфизма этого гена, связанный с увеличением риска заболеваний, в гомозиготной форме (T/T) — 14.15%; мутация гена *FV (Leiden)* — 2.83 % носителей в гетерозиготном состоянии (G/A); мутация гена протромбина (*FII*) — 9.43 % носителей в гетерозиготном состоянии (G/A); мутация гена *MTR* — 25.77 % носителей в гетерозиготном состоянии (G/A) и мутантный вариант полиморфизма этого гена, связанный с увеличением риска заболеваний, в гомозиготной форме — 4.12%; мутация *ITGA2* — 39.78 % носителей в гетерозиготном состоянии (C/T) и мутантный вариант полиморфизма данного гена, связанный с увеличением риска заболеваний, в гомозиготной форме — 6.45 %.

Таким образом, определение вариантов полиморфизма генов системы свертываемости крови имеет важное практическое значение для выявления и предупреждения тромбофилических состояний и вызываемых ими осложнений.

ВЫСШИЕ УРОВНИ КОМПАКТИЗАЦИИ ХРОМАТИНА В РСС-ХРОМОСОМАХ. © Т. А. Карягина, В. В. Бураков, Ю. С. Ченцов. Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, vburakov@mail.ru

Вопрос о структуре и особенностях высших уровней компактизации хроматина как в интерфазных ядрах, так и

в митотических хромосомах по сей день остается открытым. На данный момент предложено множество моделей, в которых отражается тот или иной взгляд на решение данной задачи с учетом факторов окружающей среды и особенностей объекта исследования. Вопросы о существовании хромонемы как высшего уровня компактизации хроматина, способов ее образования из 30-нанометровой фибриллы, структуре хромонемы и механизме, согласно которому она сворачивается в нормальную митотическую хромосому, еще не являются решенными окончательно.

Хромонему как фибриллу хроматина диаметром около 100 нм можно наблюдать на ультраструктурном уровне в норме в процессах конденсации—деконденсации хроматина в профазе и телофазе митоза клеток животных. Кроме того, очень четко выявляются хромонемные элементы в составе митотических хромосом после обработки их растворами, содержащими ионы Ca^{2+} (Бураков и др., 2005). Причем наблюдается такое «подчеркивание» хромонемной структуры конденсированного хроматина на всех стадиях митотического цикла.

Возникает вопрос: насколько универсален этот высший — хромонемный — уровень компактизации хроматина, всегда ли он проявляется при конденсации интерфазного хроматина в хромосомоподобные структуры? Для выяснения этого вопроса нами был применен метод получения преждевременно конденсированных хромосом (РСС) из хроматина интерфазных клеток перевиваемой культуры СНО с помощью реагента каликулина A.

Как и ожидалось, воздействие каликулина вызывает специфическую митозоподобную конденсацию хроматина в ядрах клеток СНО, находящихся на всех стадиях клеточного цикла. Ультраструктурные исследования показали большое сходство РСС-хромосом, образовавшихся из хроматина ядер в G_2 -периоде, с обычными метафазными хромосомами и достаточно разнообразие хромосомных структур, образовавшихся из G_1 хроматина, причем очевидно, что это структуры, соответствующие одной хроматиде. При этом ультраструктура РСС-хромосом из ядер в S -периоде, как и ожидалось, обнаруживала некий промежуточный характер.

Экспериментальное выявление хромонемного уровня в кальциевой среде показало, что по ультраструктуре хромонема в G_2 РСС-хромосомах практически не отличается от таковой, выявляемой подобным способом в нормальной метафазной хромосоме. G_1 РСС-хромосомы демонстрировали некоторую вариабельность диаметра хромонемоподобных структур, хотя, что важно отметить, хромонема как таковая присутствовала всегда как фибрилла, из которой складывается хроматида.

Полученные результаты позволяют полагать, что хромонема как высший уровень компактизации хроматина при его конденсации из интерфазного состояния в хромосому является универсальной структурой, необходимо образующейся в ходе этого процесса.

ЭЛИМИНАЦИЯ МИКРОЯДЕР, ИНДУЦИРОВАННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЕМ ПАКЛИТАКСЕЛА, В КЛЕТКАХ КУЛЬТУРЫ MCF-7. © О. П. Кисурина-Евгеньева, О. И. Сутягина, Г. Е. Онищенко. Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

Один из приемов химиотерапии онкологических заболеваний направлен на индукцию образования микро-

ядер (МЯ) в опухолевых клетках. МЯ возникают как при разрывах ДНК, так и при нарушении организации веретена деления. В первом случае формируются 1—2 небольших МЯ, во втором — множество более крупных МЯ, число которых может совпадать с числом хромосом. Если опухолевые клетки содержат нормальный ген белка p53, то в них происходит остановка клеточного цикла и запускается апоптотическая гибель. Однако если опухолевая клетка обладает способностью элиминировать МЯ, она может избежать гибели, и химиотерапия не будет успешной. Целью нашей работы являлось исследование возможности элиминации МЯ в клетках культуры карциномы молочной железы MCF-7. Для индукции образования МЯ на клетки воздействовали 125 нМ паклитаксела (ПТ) в течение 48 ч с последующим удалением агента (24 ч). ПТ является химиотерапевтическим препаратом, вызывающим стабилизацию микротрубочек, что приводит к накоплению К-митозов с последующим формированием МЯ ($13 \pm 4\%$ через 24 ч, $27 \pm 5\%$ через 48 и $24 \pm 2\%$ через 24 ч после удаления агента). Так как данная культура клеток содержит нормальный ген белка p53, в дальнейшем клетки с МЯ подвергаются апоптотической гибели. Апоптотический индекс составляет $8.58 \pm 0.69\%$ через 48 ч воздействия ПТ и $8.23 \pm 1.16\%$ через 24 ч после удаления агента. Морфологический анализ выявил образование двух типов МЯ — многочисленных крупных и одиночных мелких. МЯ первого типа образовались в результате нарушения формирования веретена деления. Часть таких МЯ является «вакуолизированными». Доля клеток с «вакуолизированными» МЯ составляет $25 \pm 5\%$ через 48 ч воздействия ПТ; через 24 ч после удаления агента их доля возрастает до $48 \pm 4\%$. Окрашивание моноданзил кадаверином и LysoTracer DND-99 показало, что, несмотря на вакуолизацию, эти микроядра не подвергаются аутофагической и лизосомной деградации. Электронно-микроскопическое исследование показало, что в таких микроядрах происходит набухание перинуклеарного пространства. Второй тип МЯ, выявленный в культуре MCF-7, представлен одиночными мелкими структурами. Можно предположить, что эти микроядра формируются в результате двойных разрывов ДНК. Такие микроядра могут элиминироваться с помощью лизосомной деградации или с помощью экструзии из клетки путем образования «блесков». Анализ распределения белка p53 в микроядрах при действии ПТ показал, что данный белок может присутствовать как во всех микроядрах, так и только в некоторых (независимо от размера и «вакуолизации»). Это означает, что p53-опосредованная индукция остановки клеточного цикла и апоптотическая гибель клеток при действии ПТ не связаны с особенностями морфологии МЯ.

Таким образом, воздействие ПТ на клетки культуры MCF-7 индуцирует возникновение двух групп МЯ, вероятно различных по биогенезу и способу элиминации. Наши данные показывают, что клетки культуры MCF-7 могут элиминировать одиночные МЯ. Это в свою очередь может служить защитным механизмом от p53-опосредованного апоптоза. Однако в случае образования большого числа МЯ, которые могут быть элиминированы путем «вакуолизации», индуцируется p53-опосредованная гибель опухолевых клеток.

ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ТРАНСГЕННЫХ 3-СУТОЧНЫХ ЭМБРИОНОВ ВЬЮНОВ С ГЕНА-

МИ *TAF1α* И *TAF1β*. © Л. В. Козикова,¹ В. В. Ненашева,² И. В. Макарова,² Л. Е. Андреева.² ¹Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных, Санкт-Петербург—Пушкин, larkozik@list.ru, и ²Институт молекулярной генетики РАН, Москва, leandr@yandex.ru

В настоящее время функции многих секвенированных генов остаются неизвестными. К числу малоизученных генов относятся гены *TAF1α* и *TAF1β* (template activating factor). Обе формы входят в комплекс INHAT (ингибитор гистоновых ацетилтрансфераз) и содержат домен NAP (nucleosome assembly protein). Возможно, они способствуют усилению транскрипции ряда генов и различаются 24 аминокислотами на N-конце. Ряд авторов предполагают, что *TAF1β* может выполнять онкогенную функцию и участвовать в моделировании хроматина, влияя на транскрипцию генов. Связывание *TAF1α* с нуклеосомами значительно слабее, чем *TAF1β*. Целью данной работы было изучение биологической роли генов *TAF1α* и *TAF1β* в раннем эмбриональном развитии вьюнов с учетом пролиферативной активности клеток. Объектом исследования служили эмбрионы вьюнов, полученные методом искусственного оплодотворения. Плазмиды с генами *TAF1α* и *TAF1β* под контролем промотора CMV и дистиллированную воду (в качестве контроля) в концентрации 20 нг/мкл инъецировали в область бластодиска оплодотворенных икринок вьюнов при помощи микроманипулятора фирмы Eppendorf и стеклянной микроиглы с диаметром кончика 14 мкм. Анализ эмбриональной клеточной популяции проводили на 3-и сут развития. Экспрессию генов определяли методом ПЦР. На 3-и сут развития наблюдали эмбрионы как с нормальной морфологией развития, так и с аномальными формами. Аномалии развития (неровный край обрастаания бластодермы, искривление осевого комплекса, запаздывание выпулления, нарушения двигательных функций и др.) наблюдались в большем проценте случаев у экспериментальных зародышей по сравнению с контрольными. На цитологических препаратах 3-суточных зародышей проводили анализ пролиферации по количеству делящихся клеток в процентах (M). После введения дистиллированной воды достоверной разницы между инъецированными и интактными зародышами по митозам не обнаружено, что указывает на то, что сам процесс микроинъекции не оказывает негативного влияния на пролиферативную активность клеток. При сравнении показателей пролиферативной активности у эмбрионов с нормальной морфологией, которым инъецировали дистиллированную воду (M = 4.22 %), и нормально развитых трансгенных эмбрионов с геном *TAF1α* (M = 5.13 %) была выявлена достоверная разница (P ≤ 0.05). Подобную картину наблюдали при анализе зародышей с аномальным развитием. Сравнительный анализ пролиферативной активности между трансгенными аномальными (M = 5.30 %) формами развития и аномальными по морфологии эмбрионами с введенной дистиллированной водой (контроль) был близок к достоверной разнице (P = 0.04). У трансгенных эмбрионов с геном *TAF1β* как у аномальных форм развития, так и у зародышей с нормальной морфологией показатели пролиферации были еще выше (M = 6.05 и 6.11 %) и достоверно отличались от контроля (P ≤ 0.001). Таким образом, предложенная нами цитологическая оценка ранних эмбрионов выявила достоверное повышение процессов пролиферации у трансгенных зародышей с генами *TAF1α*

и особенно *TAF1β* в раннем эмбриогенезе, что косвенно может подтверждать онкогенные свойства этих генов. Необходимы дальнейшие исследования влияния генов *TAF1α* и *TAF1β* на организм.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития».

АНАЛИЗ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ЛОКУСОВ ХРОМАТИНА В СПЕРМАТОЦИТАХ I ПОРЯДКА ЧЕЛОВЕКА. © *O. L. Коломиец, К. А. Пасынкова, В. Е. Спандеберг*. Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва, olkolomiets@mail.ru

С помощью FISH с ДНК-зондами к уникальным последовательностям ДНК описана структурная организация локусов хроматина разной протяженности (от 60 до 1250 кб) в профазе I мейоза человека. Исследование проведено на препаратах распластанных ядер сперматоцитов I человека (информированное согласие каждого пациента получено). Синаптонемные комплексы (СК) мейотических хромосом окрашивали с помощью антител к основному белку СК — SCP3. Транскрипционную активность хроматина выявляли с помощью антител к РНК-полимеразе II, сайленсинг транскрипции — с помощью антител к гистону гамма H2AX. Использование этих антител упрощало определение стадий профазы I мейоза. СК формируется между двумя гомологичными хромосомами на стадиях зиготены—пахитены. Большинство моделей организации мейотической хромосомы в профазе I мейоза отображают СК как структуру, строго разделяющую петли гомологов, лежащие по разные стороны от СК. Каждый из гомологов состоит из двух хроматид, поэтому предполагалось, что использование метода FISH для идентификации определенных сайтов хроматина, связанных с СК, позволит идентифицировать четыре петли хроматина в соответствии с четырьмя хроматидами (четырьмя копиями уникальных последовательностей, меченых зондами). Однако такую картину мы наблюдали лишь в единичных ядрах на стадии средней пахитены—поздней диплотены. На более ранних стадиях профазы чаще наблюдали плотные глыбки хроматина, прижатые к СК, что соответствует хромомерному строению мейотических хромосом. Реже выявлялся диспергированный хроматин, состоящий из мелких гранул. Причем в одном и том же ядре и даже в структуре одной хромосомы меченный один зондом прителомерный участок хроматина может иметь вид вытянутых нитей, состоящих из мелких гранул, а интерстициальный участок хроматина той же хромосомы, меченный другим зондом, иметь довольно плотную, компактную структуру. На стадии средней пахитены хорошо распластываются интерстициальные петли, прителомерные петли чаще остаются компактными. Особый интерес представляет факт выявления линейных структур хроматина, меченых зондом. Такая линейная стержневая структура хроматина в одних случаях пересекала СК, в других она была разделена СК. Такую картину описали и другие исследователи (Heng et al., 1994; Froenicke et al., 2002; Pigozzi, 2007). Эти авторы предполагали, что они наблюдают продольное взаимодействие сестринских петель хроматина — с каждой стороны от СК две сплетенные между собой сестринские хроматиды

выглядели как стержень. Это предположение вполне логично: действительно, выявляются две нитевидные структуры вместо четырех ожидаемых, следовательно, они попарно продольно соединены. Это вполне соответствует модели Инагаки (Inagaki, 2010), демонстрирующей связь петель хроматина с помощью когезинов как у основания петель, так и на их протяжении. Однако в тех случаях, когда окрашенный методом FISH «стержень» хроматина непрерывен и пересекает СК, более логичным кажется предположение о продольном взаимодействии петель не только сестринских, но и гомологичных хромосом. В сперматоцитах курицы такие картины представлены многократно (Pigozzi, 2007). Мы полагаем, что продольный контакт петель несестринских хромосом необходим в том числе в связи с потребностью в reparации спонтанных разрывов ДНК, вызванных действием эндогенных факторов и факторов окружающей среды.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-02071).

ОЦЕНКА ГЕМОПОЭЗА ПУТЕМ СЕРЕБРЕНИЯ ЯДРЫШКОВЫХ ОРГАНИЗАТОРОВ У ГРЫЗУНОВ ПРИ ВВЕДЕНИИ АНТАГОНИСТА ОРЕКСИНА A₃. © *Г. П. Косякова, О. М. Родионова, Е. Н. Селина*. Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург, galkos1@mail.ru

Эукариотическая клетка — это универсальная единица материи, которая участвует в обмене веществ и энергии, обладает свойствами самосохранения, воспроизведения и саморегуляции. Ядерный аппарат — это субсистема клетки, состоящая из кариоплазмы, ядерного матрикса и генетического материала (хромосом или хроматина). Ядрышковые организаторы (ЯОР) находятся на вторичных перетяжках определенных хромосом. Это участки, несущие гены рРНК (рибосомные цистроны), а также белки, необходимые для транскрипции и синтеза пре-рРНК. Вместе с ядрышковым матриксом и созревающими субъединицами хромосом ЯОР формируют ядрышко — универсальную ядерную структуру. В ядрышке осуществляется синтез молекул-предшественников рибосом. На рибосомах в цитоплазме синтезируются белки, необходимые для всех процессов жизнедеятельности и функционирования клетки — пролиферации, старения, апоптоза, иммунного ответа и т. д. Форма и число ядрышек связаны с направлением и уровнем дифференцировки клетки. Структура ядрышек отражает функциональное состояние клетки, а также уровня ее метаболической и пролиферативной активности. Для идентификации и диагностики состояния ЯОР используют метод окрашивания нитратом серебра. Этот метод основан на высоком сродстве ядрышковых белков к ионам серебра. Он позволяет оценить уровень транскрипции и созревания пре-рРНК, обладает специфичностью и позволяет выявить ядрышко отдельно от окружающего хроматина. Благодаря аргентофильности можно оценить активность рибосомных цистронов и интенсивность биосинтеза белка в каждой конкретной клетке. В нашей работе поставлена задача: определить, влияет ли антагонист орексина A₃ на экспрессию рибосомных цистронов периферической крови. В эксперименте использовано 46 крыс породы Wistar. Мы изучали изменения, произошедшие с клетками, после одно-

кратного введения подопытным крысам антагониста орексина A₃ в дозе 200 мг, а также при многократном введении в дозе 20 мг антагониста орексина A₃ и в фазе реабилитации через 2 нед при многократном введении. Существует мнение о том, что после введения данного препарата картина кроветворения претерпевает несущественные изменения. Наблюдается заметный количественный сдвиг в соотношении отдельных пулов кроветворения, что может, на наш взгляд, являться характеристикой влияния разных доз антагониста на состояние гемопоэза животных. Мазки костного мозга крыс содержали большое количество клеток как в контроле, так и в опыте после введения антагониста орексина A₃. Изучая экспрессию рибосомных цистронов периферической крови крыс при введении антагониста орексина A₃ в острой, подострой фазах и в фазе реабилитации, мы заметили, что количество яиц ОР (интерфазных ядрышковых организаторов) составляет 1.58 ± 0.17 в контроле и 2.01 ± 0.07 в опыте, фибрillлярных центров (ФЦ) — 4.26 ± 0.21 в контроле и 5.38 ± 0.40 в опыте, различия достоверны при $P < 0.05$. Интересно отметить, что частота встречаемости ФЦ, которые являются маркерами цитологической активности и ЯОР, была выше в лимфоцитах крыс в опытной группе при введении антагониста орексина по сравнению с контрольной. Следует отметить, что у самцов опытной группы имеет место тенденция к повышению частоты встречаемости ФЦ в лимфоцитах периферической крови. Полученные результаты свидетельствуют о положительном воздействии антагониста орексина на геном и протеом крыс в острой, подострой фазах и в фазе реабилитации.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПОЛОВОЙ ХРОМОСОМЫ В ХОДЕ ПОЛИТЕНИЗАЦИИ ЯДЕР ТРОФОЦИТОВ ВИДОВ *DROSOPHILA* ПОДГРУППЫ *MELANOGASTER*. © А. А. Коханенко, Г. Н. Артемов, Н. М. Немирович-Данченко, В. Н. Стегний. Томский государственный университет, alinakokhanenko@gmail.com

Пространственная организация хромосом в ядре — один из разделов современной клеточной биологии, который получил широкое распространение и весьма актуален в современной клеточной биологии. Одним из главных вопросов, возникающих при изучении архитектуры ядра, является вопрос относительно кинетики хромосом и законов, которым это движение подчиняется. Ранее нами было показано, что в ядрах трофоцитов *Calliphora erythrocephala* в ходе политенизации происходят крупномасштабные перемещения хромосом. На начальных этапах политенизации половая хромосома 6 расположена в центре ядра. А вот на завершающих этапах происходит перемещение материала половой хромосомы на периферию. Кроме того, в пространстве ядра выявляется большое количество мелких сигналов ДНК-зонда половой хромосомы 6.

Исследование закономерностей преобразования ядерной архитектуры у *Drosophila* в подгруппе *melanogaster* крайне интересно, так как в этой филогенетической группе мы можем наблюдать кардинальные преобразования в архитектуре хромосом: хромоцентрическая организация (*D. simulans*), без хромоцентра (*D. mauritiana*) и с прикреплением хромосом к оболочке ядра (*D. melanogaster*). С помощью метода 3D флуоресцентной гибридизации *in situ* нами была изучена организация хромосом-

мы XL в пространстве ядер трофоцитов видов *Drosophila* в подгруппы *melanogaster* в ходе политенизации.

В результате проведенного исследования в подгруппе *melanogaster* нами не было обнаружено характерного для ядер трофоцитов *C. erythrocephala* перемещения половой хромосомы из центральной части ядра на периферию в ходе политенизации. На всех стадиях политенизации у всех изученных видов подгруппы с хромоцентрической организацией (*D. simulans*), без хромоцентра (*D. mauritiana*) и с прикреплением хромосом к оболочке ядра (*D. melanogaster*) половая хромосома локализована на периферии ядра. Однако была отмечена небольшая динамика хромосомы XL. С увеличением степени политенизации хромосома XL рассредоточивается и занимает более обширную область. Также было показано, что в ядрах трофоцитов *D. melanogaster* на поздних стадиях политенизации выявляются районы локализации хромосомы XL на значительном расстоянии от основной массы материала хромосомы. На противоположном полюсе ядра от расположения основной массы хромосомы XL выявляются компактные районы локализации хромосомы XL. У других изученных видов подобного явления не было обнаружено.

Таким образом, можно судить о том, что в отличие от трофоцитов *C. erythrocephala*, в ядрах которых происходят крупномасштабные изменения организации половой хромосомы в объеме ядра в ходе политенизации, в ядрах трофоцитов видов *Drosophila* подгруппы *melanogaster* подобного перемещения хромосом не происходит. Лишь у *D. melanogaster* описана динамика хромосомы XL в ходе политенизации, что свидетельствует о разном уровне активности половой хромосомы у разных видов в одной подгруппе. Проведенный анализ позволил судить о том, что имеются различия в функционировании ядер в ходе политенизации как между разными семействами (*Calliphoridae* и *Drosophilidae*), так и между представителями одной подгруппы видов (подгруппа *melanogaster* видов *Drosophila*).

Работа выполнена при финансовой поддержке стипендии президента РФ (СП-1037.2013.4) и частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-32078-мол_а).

РОЛЬ ТРАНСКРИПТОВ ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ ДНК В ФОРМИРОВАНИИ ЯДЕРНЫХ ДОМЕНОВ. © А. В. Красикова, Д. Б. Червякова, А. М. Злотина, Т. В. Куликова, А. В. Федоров. С.-Петербургский государственный университет, alla.krasikova@gmail.com

Определение функций вновь обнаруживаемых в клетке длинных не кодирующих белки РНК (нкРНК) представляет собой актуальную задачу. Многие вновь синтезируемые нкРНК остаются ассоциированными с сайтами своей транскрипции на хромосомах. В случае транскрипции tandemных повторов ДНК образуются длинные нкРНК, которые содержат регулярно повторяющиеся сайты связывания определенных РНП- и белковых комплексов, привлекая их в специфичные районы хромосом. Вместе с тем функциональное значение такой транскрипции в большинстве случаев остается неизвестным. Настоящее исследование посвящено характеристике ряда ассоциированных с хромосомами ядерных доменов, формируемых в результате транскрипции массивов tandemно-

повторяющихся последовательностей ДНК. На примере нового некодирующего тандемного повтора ДНК LL2R (от англ. lumpy loop 2 repeat), обнаруженного на длинном плече хромосомы 2 *Gallus gallus domesticus* с помощью биоинформационического анализа, мы представляем модель формирования таких ядерных доменов. С помощью ДНК/РНК флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) мы продемонстрировали, что некодирующие транскрипты повтора LL2R обогащены в так называемых глыбчатых петлях, формирующихся на хромосоме 2 курицы в растущих ооцитах. Обработка РНКазой А полностью устранила гибридизацию зонда с глыбчатыми петлями. Это означает, что идентифицированный тандемный повтор транскрибируется во время оогенеза, а его транскрипты принимают участие в формировании сложных петель необычной морфологии на хромосомах типа ламповых щеток. Транскрипционная активность тандемного повтора LL2R в ооцитах курицы была подтверждена с помощью ОТ-ПЦР, а также с помощью клонирования и секвенирования кДНК. При использовании в ОТ-ПЦР олиго(dT) в качестве праймера для синтеза первой нити кДНК были получены продукты разных длин, соответствующие мономеру и димеру повтора LL2R. Эти данные свидетельствуют о наличии полиаденилированного 3'-конца у первичного транскрипта LL2R. FISH с LNA (locked nucleic acid) зондами, специфичными к разным нитям повтора, позволила определить направление транскрипции и транскрибуемую на хромосомах типа ламповых щеток нить ДНК локуса LL2R. Продолжающаяся транскрипция повтора LL2R была подтверждена с помощью обнаружения элонгирующей формы РНК-полимеразы II с гиперfosфорилированным CTD-доменом в транскрипционных единицах, содержащих повтор. В то же время петли, формируемые повтором LL2R, демонстрировали низкую скорость транскрипции по сравнению с подавляющим большинством латеральных петель хромосом.

Одно из преимуществ хромосом типа ламповых щеток ооцитов — это возможность цитологического анализа котранскрипционных этапов процессинга РНК. Этот анализ показал, что транскрипты повтора LL2R котранскрипционно взаимодействуют с факторами сплайсинга пре-мРНК — ТМГ-кэпированными мяРНК, U6 мяРНК, Sm-белками сплайсосомных РНП-частиц, SR-белком SC35, но не белком L мяРНП-частиц. РНП-матрикс с транскриптами повтора LL2R может представлять собой депо факторов сплайсинга или регулировать их концентрацию в нуклеоплазме. Можно предположить, что формирование таких депо в ядрах ооцитов инициируется активной транскрипцией тандемных повторов ДНК, что подтверждает гипотезу зарождения ядерных доменов в результате транскрипции нкРНК.

Работа выполнена при технической поддержке РЦ «Хромас», РЦ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» и МРЦ по направлению «Нанотехнологии» (С.-Петербургский государственный университет).

НЕОБЫЧНЫЙ СЛУЧАЙ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КАРДИОМИОЦИТОВ В НЕПОВРЕЖДЕННОМ СЕРДЦЕ ВЗРОСЛОЙ ТРАВЯНОЙ ЛЯГУШКИ.
© М. И. Крылова, О. А. Быстрова, О. И. Емельянова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, heart-dev@mail.cytspb.rssi.ru

Основная задача регенеративной медицины заключается в восстановлении поврежденной ткани. Ограниченнность регенераторного потенциала кардиальной мышцы взрослых млекопитающих обусловлена крайне слабой способностью кардиомиоцитов входить в клеточный цикл и митотически делиться. В отличие от млекопитающих у некоторых представителей низших позвоночных, таких как аквариумная рыбка *Danio rerio*, тритоны и лягушки, дифференцированные кардиомиоциты пролиферируют не только в процессе нормального развития, но также и в течение регенераторного миогенеза у взрослых особей (Ruttyantsev, 1973; Oberpriller et al., 1995; Kikuchi, Poss, 2012). Данные о кардиомиогенезе в интактном сердце взрослых лягушек отсутствуют. Как правило, неоперированное сердце лягушки используют в качестве контроля к экспериментальному материалу, небезосновательно считая, что кардиомиоциты этого сердца не пролиферируют. Тем не менее известно, что рост взрослых особей продолжается в течение долгого времени, и увеличение массы сердца происходит пропорционально увеличению массы тела лягушки (Cerra et al., 2006). В процессе исследования экспериментально неповрежденных сердец взрослых лягушек мы обнаружили, что в период адаптации высаженных из ходильника (8 °C) амфибий к комнатным условиям (22 °C) содержания в сердцах некоторых особей происходит реактивация пролиферативной активности кардиомиоцитов. Данная гиперпластическая миокардиальная реакция оказалась воспроизводимой. С помощью иммуногистохимического окрашивания на ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA) определяли индекс меченых ядер кардиомиоцитов. Параллельно определяли число митозов — митотический индекс. PCNA, выявляемый в ядрах клеток, вошедших в митотический цикл, был обнаружен в 20 % кардиомиоцитов желудочка и 11.6 % кардиомиоцитов предсердий. Митотический индекс кардиомиоцитов желудочка составил 1.3, а предсердий — 1.06 %. На гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, удалось выявить все фазы митоза. Данные ультраструктурного исследования делящихся митозом клеток убедительно показали, что в митотический цикл входят собственно дифференцированные кардиомиоциты. Делящийся миоцит не теряет при этом связи с окружающими его мышечными клетками, так как сохраняются десмосомы и вставочные диски. Структура сократительного аппарата варьирует в зависимости от фазы митоза. Дедифференцировка кардиомиоцитов характеризуется редукцией саркомерных структур. К ультраструктурным изменениям, возможно не связанным с митотическим делением клеток, следует отнести полное исчезновение гликогена из саркоплазмы и изменение формы и тонкого строения митохондрий. Учитывая тот факт, что кардиомиоциты лягушки сохраняют пролиферативный потенциал в течение всей жизни, обнаруженная нами миокардиальная гиперплазия могла быть простимулирована экзофизиологическими факторами. Понимание причины, а также исследование молекулярных механизмов реактивации пролиферативной активности дифференцированных кардиомиоцитов экспериментально неповрежденного сердца взрослой лягушки помогут объяснить регенераторный дефицит в поврежденных сердцах взрослых млекопитающих и человека.

ДИНАМИКА ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ХРОМАТИНА ПРИ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОМ СОЗРЕВАНИИ ООЦИТОВ

BOS TAURUS, ЗАВЕРШИВШИХ ФАЗУ РОСТА IN VIVO ИЛИ IN VITRO. © Т. И. Кузьмина,¹ А. И. Чаушева,² Х. Альм,³ Х. Торнер,³ И. Н. Чаушев.² ¹Всероссийский государственный научно-исследовательский институт генетики и разведения животных, Санкт-Петербург, ²Северо-Кавказская государственная гуманитарно-технологическая академия, Медицинский институт, Черкесск, и ³Институт биологии сельскохозяйственных животных, Думмерсторф, Германия.

Применение в качестве зонда для приживленного тестирования ооцитов красителя бриллиантового кристаллического голубого (BCB) — индикатора активности глюкозо-б-фосфатдегидрогеназы — позволяет оценивать функциональный статус донорских ооцитов животных: растущие или завершившие фазу роста (Rodriguez-Gonzalez et al., 2002; Bhojwani et al., 2007). Пригодными для культивирования считаются ооциты из фолликулов диаметром 5—8 мм. При BCB-тестировании таких ооцитов обнаружено, что 70 % их оценивались как завершившие фазу роста in vivo [BCB(+)], а 30 % находились в фазе роста [BCB(–)] (Кузьмина и др., 2010). BCB(+)-ооциты обладали высокой компетентностью к созреванию in vitro и оплодотворению, и наоборот, выход доимплантационных эмбрионов из BCB(–)-ооцитов был значительно ниже (Heleil et al., 2010). В наших экспериментах проведен сравнительный анализ динамики преобразования хроматина исследуемых ооцитов при созревании in vitro. Для проведения BCB-диагностики ооцит-кумуллюсные комплексы коров (ОКК), забитых на мясокомбинате, отмывали в растворе Дюльбекко с 0.4 % бычьего сывороточного альбумина. Затем 90 мин подвергали воздействию раствора 26 мКМ BCB (B-5388, Sigma) в Дюльбекко, ОКК отмывали в растворе Дюльбекко и разделяли на ооциты с голубой окраской — завершившие фазу роста, а без окраски цитоплазмы — растущие. Для созревания ооцитов использовали среду TC-199 с 10 % фетальной бычьей сыворотки (Sigma), кондиционированную клетками гранулемы (10^6 клеток на 1 мл среды), с добавлением 50 нг/мл бычьего пролактина. Режим культивирования и оплодотворения ооцитов, культивирования эмбрионов соответствовал изложенному в методических рекомендациях (Кузьмина и др., 2009). Для сравнения результатов экспериментов использовали критерий χ^2 , данные обрабатывали с помощью статистической программы Sigma Stat. Хроматин завершивших фазу роста ооцитов перед началом культивирования характеризуется отсутствием или незначительным количеством ядрышек независимо от морфологии окружающих их клеток кумуллюса, что косвенно подтверждает завершенность синтетических процессов в этих клетках перед блокировкой мейоза (5.3 ± 2.9 против 24.6 ± 5.2 , $P < 0.05$). Через 6 ч культивирования основная часть ооцитов во всех исследуемых группах находилась на стадии диплотены. После 12 ч культивирования лишь 50 % BCB(–)-ооцитов продвинулись в своем развитии, в то время как 98 % BCB(+)-ооцитов и 94 % ооцитов в контрольной группе реинициировали мейоз. Через 18 ч экспозиции на завершающих этапах мейотического созревания находилось 59 % ооцитов контрольной группы, 72 % BCB(+)-ооцитов и 38 % BCB(–)-ооцитов. Основная масса BCB(+)-ооцитов (81 %) и ооцитов контрольной группы (70 %) достигла стадии метафазы II через 24 ч, и лишь 52 % BCB(–)-ооцитов завершили ядерное созревание. После 30 ч экспозиции на стадии метафазы II находился уже 71 % BCB(–)-ооцитов, не изменилась доля вы-

хода зрелых яйцеклеток в контрольной группе и в группе, где культивировали BCB(+)-ооциты. Не обнаружено достоверных различий в доле дегенерированных ооцитов в процессе культивирования вплоть до 30 ч в исследуемых группах. Полученные данные свидетельствуют о возможности ооцитов, не завершивших фазу роста in vivo, при пролонгировании времени культивирования завершить ядерное созревание in vitro.

АССОЦИРОВАННЫЕ С ХРОМОСОМАМИ ЯДЕРНЫЕ ДОМЕНЫ В РАСТУЩИХ ООЦИТАХ ГОЛУБЯ *COLUMBA LIVIA* СОДЕРЖАТ МАРКЕРНЫЙ БЕЛОК ПАРАСПЕКЛОВ P54/NRB, БЕЛОК гяРНП I И ПОЛИ(A)⁺-РНК. © Т. В. Куликова, Д. Б. Червякова, А. В. Красикова, Е. Р. Гагинская. С.-Петербургский государственный университет, t.v.kulikova@gmail.com

Параспеклы — ядерные домены соматических клеток млекопитающих, участвующие в регуляции экспрессии генома путем удержания РНК в ядре. Формирование параспеклов обусловлено экспрессией длинной некодирующей РНК NEAT1, которая взаимодействует с гетеродимером мультифункциональных белков p54/nrb и PSF/SFPQ, связывающих гиперредактированные участки РНК. Таким образом, параспеклы предотвращают экспорт специфических мРНК в цитоплазму и обеспечивают накопление мРНК в ядре, что позволяет клетке при поступлении соответствующего сигнала высвободить накопленные мРНК и быстро продуцировать большое количество необходимого белкового продукта.

Ранее мы показали, что в ядрах ооцитов многих видов птиц в терминальных районах хромосом типа ламповых щеток формируются РНП-содержащие структуры — гигантские терминальные петли (ГТП), накапливающие полиг(A)⁺-РНК и факторы сплайсинга (мяРНП и SC35). Накопление полиаденинированных транскриптов в ГТП позволяет предполагать, что они участвуют в удержании РНК в ядре. В представленной работе мы исследовали методом иммунофлуоресценции распределение маркерных белков параспеклов p54/nrb и PSF/SFPQ на препаратах содержащего ядер растущих ооцитов голубя. РНП-матрикс большинства латеральных петель хромосом типа ламповых щеток голубя обогащен белком PSF/SFPQ, но не белком p54/nrb. Белок PSF/SFPQ отсутствует во всех ГТП и интерстициальных петлях со сложным РНП-матриксом. В то же время антитела против белка p54/nrb выявляли в основании ГТП ряда микрохромосом длинные, перепутанные и равномерные по толщине тяжи. Такие ГТП отличались от остальных морфологически и соответствовали описанным в ранних работах так называемым колпачкам. Эти структуры формируются в районе терминального DAPI-позитивного хромомера, из которого исходит несколько латеральных петель, также выявляемых с помощью DAPI. Выявление элонгирующей формы РНК-полимеразы II и инъецированного в ооциты бром-УТФ показало неравномерность транскрипционной активности вдоль осей этих петель. Тяжи, выявляемые в основании «колпачков» с помощью антител против белка p54/nrb, связываются также с антителами против белка гяРНП I/PTB, а одновременная детекция белков p54/nrb и гяРНП I/PTB выявила чередование флуоресцентных сигналов вдоль длинных спутанных тяжей в основании «колпачков»; последующее выявление полиг(A)⁺-РНК показало колокализацию иммунофлуоресцентных сигна-

лов с сигналами FISH. Специфичность антител против белков p54/nrb, PSF/SFPQ и гяРНП I/РТВ человека к соответствующим белкам птиц подтвердили с помощью иммуноблотинга ядерного экстракта из клеток печени курицы.

Представленные результаты свидетельствуют об участии транскриптов последовательностей, экспрессирующихся в районах формирования «колпачков» и связывающих белок p54/nrb и белок гяРНП I/РТВ, в формировании доменов, удерживающих РНК в ядре. По-видимому, существует разнообразие транскриптов, отвечающих за формирование удерживающих РНК доменов (других ГТП) в ядрах ооцитов голубя. В растущих ооцитах птиц белок SPPQ/PSF, вероятно, не участвует в удержании РНК в ядре, а функционирует как фактор сплайсинга.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ (НШ-3553.4.2014), при технической поддержке РЦ «Хромас» и РЦ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» (С.-Петербургский государственный университет).

ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ ЯДЕРНОЙ ОБОЛОЧКИ ИНТЕРФАЗНЫХ КЛЕТОК, ВЫЯВЛЯЕМЫЕ ПРИ ГИПТОНИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ. © С. Ю. Курчашова,¹ О. А. Жиронкина,^{1,2} В. Д. Черепанинец,^{1,2} О. С. Стрелкова,³ И. И. Киреев.^{1,2} ¹Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, svetak99@mail.ru, ²Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова и ³Факультет биоинформатики и биоинженерии Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

Упорядоченное расположение интерфазных хромосом в ядре и перемещения их отдельных участков в связи с событиями клеточного цикла могут определяться взаимодействием хроматина с ядерной оболочкой (ЯО). По-видимому, ядерная ламина принимает непосредственное участие в этом процессе. Показано, что гиптоническая обработка культивируемых клеток СПЭВ и последующий возврат в среду культивирования на 2 ч индуцируют в некоторых клетках (около 3 %) выпячивания ядерной оболочки — ядерные почки. При импульсном мечении клеток СПЭВ аналогами тимицина (бромдезоксиуридином и этинилдезоксиуридином) до гиптонической обработки обнаружено, что ядерные почки образуются преимущественно в синтетическом периоде клеточного цикла. Параллельно наблюдается накопление меченого хроматина в почке при отложенном мечении, что свидетельствует о направленной миграции в почку реплицированного хроматина. При электронно-микроскопическом исследовании обнаружено, что в ядерной почке контакты между хроматином и ЯО немногочисленны, возможно из-за локальной разборки ламины: ламин В в ядерных почках не выявляется, а количество ламинов А/С значительно снижено по сравнению с другими областями ядерной оболочки. Предполагается, что образование ядерных почек после гиптонического шока объясняется существованием локальных зон разборки ламины, связанных с пререпликативной реорганизацией взаимодействия хроматина с ЯО.

Перераспределение реплицированного хроматина в ядерную почку может свидетельствовать в пользу его активного транспорта в эту зону. Предварительная инкубация клеток с ингибитором миозина 2 и миозиновой АТФазы 2,3-бутандионмонооксимом (БДМ) до гиптонического воздействия подавляла перераспределение меченого хроматина в почку. Инкубация клеток с ингибитором репликации афидиколином также подавляла перераспределение хроматина в почку, что позволило предположить существование корреляции между перемещениями локусов хроматина, репликацией и структурой ядерной оболочки.

Более детальное изучение клеток с почками показало, что почки выявляются в клетках СПЭВ после 5 мин гиптонического воздействия. Структура хроматина в почке после 5 мин гиптонической обработки при этом отличается от структуры хроматина в почке после 1 ч гиптонического воздействия и 2-часовой инкубации в полной среде. В ЯО ядерных почек не выявляются ламины А и В, а также нуклеопорины. Кратковременное гиптоническое воздействие не приводит к значительным нарушениям расположения сайтов репликации в ядрах (в ранней, средней и поздней S-фазе), что позволяет определить стадию репликации, на которой находится клетка с почкой. Таким образом, модельная система клеток с почками после кратковременного гиптонического воздействия может быть использована для идентификации микродоменов в ядерной оболочке, в которых разобрана ядерная ламина. В составе таких микродоменов можно идентифицировать наличие или отсутствие других белков ядерной ламины, а изменения в структуре ламины, выявляемые гиптонической обработкой, можно соотнести со стадией репликации.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-00885).

АНАЛИЗ СОСТАВА ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ЯДРЫШЕК В РАННИХ ЭМБРИОНАХ МЫШИ С ПОМОЩЬЮ РНК- И БЕЛОК-СПЕЦИФИЧНЫХ ФЛУОРОХРОМНЫХ КРАСИТЕЛЕЙ. © Е. А. Лаврентьева, К. В. Шишова, О. В. Зацепина. Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Lavrenteva-H@yandex.ru

Как известно, обязательным структурным компонентом ядер ранних эмбрионов млекопитающих являются тельца, получившие название предшественников ядрышка (nucleolar precursor bodies, NPB). У мыши транскрипционно инертные NPB существуют на стадии зиготы, а их переходные формы присутствуют вплоть до поздней морулы, когда завершается образование зрелых ядрышек. Несмотря на многолетние исследования, биохимическая природа материала, образующего NPB, до сих пор остается неизвестной. В настоящей работе для ответа на этот вопрос мы использовали два флуорохромных красителя — пиронин Y (PY), связывающийся с РНК, и флуоресцеин-5-изотиоционат (ФИТЦ), прочно взаимодействующий с α -аминогруппами белков.

Оптимизация условий окрашивания эмбрионов мыши данными красителями в сочетании с анализом препаратов методом конфокальной микроскопии показала, что основным биохимическим компонентом зиготиче-

ских NPB являются белки. По этому признаку NPB резко отличаются от ядрышкоподобных телец (NLB) предовуляторных ооцитов, которые отчетливо окрашиваются как ФИТЦ, так и РУ. ФИТЦ практически равномерно окрашивает все промежуточные (транскрипционно активные) формы NLB, а также зрелые ядрышки. Напротив, РНК выявляется в составе NLB только после возобновления транскрипции рДНК, причем РУ-позитивные сигналы видны только на поверхности NLB, тогда как их центральная часть остается неокрашенной вплоть до образования полностью активных ядрышек.

Таким образом, несмотря на ультраструктурное сходство между NLB предовуляторных ооцитов и NPB ранних зародышей и представления о тождественности этих структур, NLB и NPB различаются по биохимическому составу. В работе предлагается общая схема «судьбы» белков и РНК, синтезированных яйцеклеткой, в ранних эмбрионах млекопитающих.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект 14-34-00033).

СКОРОСТЬ МОДИФИКАЦИИ МЕТАФАЗНЫХ ХРОМОСОМ В СТАРЕЮЩИХ IN VITRO ООЦИТАХ КОРОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ГОРМОНА РОСТА. © И. Ю. Лебедева, Г. Н. Сингина, А. В. Лопухов. Всероссийский государственный научно-исследовательский институт животноводства РАСХН, Подольск—Дубровицы, irledv@mail.ru

Реализация репродуктивного потенциала самок млекопитающих зависит от множества факторов, при этом основной детерминантой является качество овулировавших ооцитов, созревших до стадии метафазы II (Wang, Sun, 2007). Вслед за завершением первого деления мейоза в ооцитах различных видов, включая коров, инициируются процессы старения, которые негативно влияют на качество яйцеклеток и их способность к дальнейшему развитию (Miao et al., 2009; Лебедева и др., 2014). В этой связи идентификация физиологических факторов, участвующих в регуляции скорости старения ооцитов, имеет большое значение для адекватного контроля fertильности самок. Известно, что старение женских гамет характеризуется рядом функциональных изменений, которые включают в себя хромосомные аномалии, дефекты веретена деления, нарушение сегрегации сестринских хроматид, повышение предрасположенности к апоптозу и партеногенезу, снижение активности фактора промоции созревания и др. (Miao et al., 2009). При этом молекулярные и клеточные изменения стареющих яйцеклеток *in vivo* сходны с таковыми, происходящими во время старения зрелых ооцитов *in vitro*. В представленной работе на модели пролонгированного культивирования ооцитов домашней коровы *Bos taurus taurus* было исследовано влияние гормона роста (ГР) на возрастные трансформации метафазных хромосом мейоза II. Морфологически нормальные ооцит-кумулюсные комплексы (ОКК) созревали в течение 20 ч в среде ТС-199, содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки, 10 мкг/мл ФСГ (Sigma) и 5 мкг/мл ЛГ (Sigma), в отсутствие (контроль 1) и в присутствии (опыт 1) 10 нг/мл бычьего рекомбинантного ГР (Monsanto, США). После созревания ОКК обеих групп переносили в среду старения ТС-199 с 10 % сыворотки (контроль 2) или в эту же среду, содержащую 10 нг/мл ГР

(опыт 2), и культивировали в течение 12, 24 и 36 ч. Для определения концентрационной зависимости гормональных эффектов комплексы культивировали в течение 24 ч в среде старения, содержащей 2.5—50.0 нг/мл ГР. Ооциты фиксировали по методу Тарковского и подвергали цитогенетическому анализу. В процессе пролонгированного культивирования яйцеклеток, созревших *in vitro* в отсутствие ГР (контроль 1), происходило постепенное возрастание (по крайней мере $P < 0.05$) доли ооцитов с аномальными изменениями морфологии метафазных хромосом с $17.2 \pm 1.6\%$ (0 ч) до 29.2 ± 4.0 , 57.2 ± 1.4 и $73.4 \pm 1.3\%$ соответственно к 12, 24 и 36 ч старения в среде без гормона (контроль 2). В этих условиях через 36 ч у $21.1 \pm 4.3\%$ яйцеклеток было обнаружено спонтанное снятие блокады метафазы II. Присутствие ГР в среде созревания ооцитов (опыт 1) не влияло на динамику последующих возрастных трансформаций метафазных хромосом, хотя и приводило к снижению частоты партеногенетической активации клеток на 36 ч (до $11.1 \pm 2.6\%$, $P < 0.05$). В то же время внесение ГР в среду старения (опыт 2) обусловливало замедление деструктивных процессов в ооцитах, созревших как в контрольной, так и в опытной группах, снижая частоту аномальных изменений хромосом до 12.8 — 20.1% (12 ч, $P < 0.05$), 38.8 — 41.9 (24 ч, $P < 0.001$) и 53.8 — 54.7 (36 ч, $P < 0.001$ %). При этом через 24 ч старения яйцеклеток максимальный эффект гормона наблюдали при концентрациях 5 и 10 нг/мл. Кроме того, ГР уменьшал долю ооцитов с признаками партеногенетической активации до 0—1.7 % ($P < 0.05$) через 36 ч пролонгированного культивирования клеток независимо от своего присутствия в среде созревания. Таким образом, ГР оказывает тормозящее влияние на скорость модификации метафазных хромосом в стареющих *in vitro* яйцеклетках коров, снижая частоту деструктивных изменений морфологии хромосом и поддерживая блокаду мейоза II.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-01888).

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ САЙТОВ РЕПЛИКАЦИИ И ОРГАНИЗАЦИЯ ХРОМАТИНА В МАКРОНУКЛЕУСЕ ИНФУЗОРИИ *PARAMECIUM TERAURELIA*. © О. Г. Леонова,¹ Б. П. Караджян,² Ю. Л. Иванова,¹ В. И. Потенко.¹

¹ Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, varjag@aport2000.ru, и ² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Клеточное ядро высших эукариот имеет строго компартментализованную организацию по принципу «хромосомных территорий». Процессы репликации и транскрипции ДНК в нем происходят в строго специфичных сайтах, которые можно визуализировать на разных стадиях S-фазы с помощью галогенопроизводных уридина и флуоресцентных меток в виде так называемых репликационных фокусов. Распределение их в пространстве ядра на разных стадиях S-фазы у всех изучавшихся клеток Метазоа оказалось сходным, поэтому можно полагать, что репликационные фокусы представляют собой фундаментальную характеристику организации ядра многоклеточных, отражающую общие принципы организации высших уровней хроматина в эволюционно удаленных видах. Однако вопрос о том, как распределяются сайты репликации в пространстве ядер одноклеточных эукариот

и как они соотносятся со структурой хроматина в последних, остается открытым.

Инфузории являются удобной модельной системой для выяснения этих вопросов. Каждая клетка инфузорий содержит одновременно ядра двух типов — транскрипционноактивные, мелкие генеративные ядра (макронуклеусы) и (обычно одно) большое полиплоидное активное соматическое ядро (макронуклеус). Все исследованные к настоящему времени инфузории можно разделить на две большие группы: виды, где геном макронуклеусов представлен молекулами ДНК генного размера (0.5—25 т. п. н.) и ДНК размером в несколько сотен т. п. н. (ДНК субхромосомного размера). В данной работе исследования проводили на инфузориях *Paramcetium tetraurelia*, которая относится к субхромосомному типу (размер молекул ДНК макронуклеуса 50—800 т. п. н.).

Для определения распределения сайтов репликации в макронуклеусе *P. tetraurelia* делящиеся клетки отсаживали в чашки Петри, в которые добавляли BrdU через разные сроки после деления. Сайты репликации визуализировали в конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 с помощью флуоресцентно меченных антител. Обнаружено, что на всех стадиях S-фазы сайты репликации распределены более или менее равномерно по всему объему макронуклеуса.

Электронно-микроскопические данные показывают, что хроматин макронуклеуса в инфузориях *P. tetraurelia* имеет вид тельца размером ~0.1—0.2 мкм, равномерно распределенных по объему макронуклеуса. При снижении активности структура хроматина ядра практически не изменилась. Полученные результаты отличаются от результатов, полученных нами в предыдущих работах на инфузориях *Bursaria truncatella*. В них при голодании тельца, расположенные в центральной части макронуклеуса, увеличиваются в размере, сближаются и агрегируют, в то время как тельца на периферии макронуклеуса остаются одиночными. При этом и распределение сайтов репликации в макронуклеусе *B. truncatella* на протяжении S-фазы было неравномерным: в периферической части ядра располагаются ранореплицирующиеся гены, в то время как в центральной части — позднореплицирующиеся.

Полученные данные могут свидетельствовать о разной пространственной организации ядер высших эукариот и соматических ядер инфузорий, обусловленной различной молекулярной организацией их геномов. В частности, если у Metazoa хроматин с ранореплицирующими генами находится в центральном компартменте ядра, то в макронуклеусе *P. tetraurelia* рано- и позднореплицирующиеся гены распределены более или менее равномерно по всему объему соматического ядра.

РИБОЗИДЫ НИКОТИНАМИДА И НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ — КЛЮЧЕВЫЕ МЕТАБОЛИТЫ ПУТЕЙ БИОСИНТЕЗА NAD В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА. © В. А. Ливинская,¹ К. А. Шабалин,¹ К. Б. Нериновский,¹

М. А. Ходорковский,¹ М. Циглер,² А. А. Никифоров.^{1,3}

¹ НИК «Нанобиотехнологии», С.-Петербургский государственный политехнический университет, veronika.livinskaya@gmail.com, ² Университет г. Бергена, Норвегия, и

³ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Никотинамидаденидинуклеотид (Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) является переносчиком электро-

нов и водорода в окислительно-восстановительных реакциях ключевых метаболических путей. Не так давно было установлено, что NAD также является субстратом для нескольких семейств регуляторных белков, контролирующих такие ключевые процессы в клетке, как экспрессия генов, правильное прохождение по клеточному циклу, репарация ДНК, апоптоз и старение. NAD-зависимые регуляторные ферменты АДФ-рибозилтрансферазы, поли-АДФ-рибозилполимеразы, деацетилазы белков (сиртуины) и АДФ-рибозилциклазы используют NAD в качестве субстрата и расщепляют его на никотинамид и АДФ-рибозу, поэтому клетке необходимо постоянно синтезировать NAD, чтобы пополнять его внутриклеточные запасы. На сегодняшний день основные пути биосинтеза NAD описаны достаточно хорошо, однако мало известно о взаимодействиях между внутри- и внеклеточными путями NAD и его ключевых метаболитов. Основными предшественниками синтеза NAD являются никотинамид (Nam), никотиновая кислота (NA) и рибозиды никотинамида (NR) и никотиновой кислоты (NAR). Ранее нами было показано, что все метаболиты NAD, добавленные во внеклеточную среду, поддерживают синтез внутриклеточного NAD, однако динуклеотиды (NAD и NAAD) и мононуклеотиды (NMN и NAMN) расщепляются до соответствующих рибозидов NR и NAR, которые входят в клетку посредством описанных переносчиков нуклеозидов.

В данной работе, используя экспериментальную модель на основе клеток печени человека HepG2, мы показали, что рибозиды NR и NAR могут выходить из одних клеток и выступать в роли предшественников для синтеза NAD в других клетках, неспособных использовать Nam и NA. В клетках HepG2 отсутствует фермент NAPRT, который отвечает за синтез NAD из NA. При этом синтез NAD из Nam подавляли ингибитором фермента NamPRT. После временной трансфекции клеток HepG2 вектором, кодирующим фермент NAPRT, выживали не только трансфицированные клетки, но и большинство нетрансфицированных соседних клеток. Это означает, что метаболиты NAD, отличные от Nam и NA, выходят из трансфицированных клеток и выступают в роли предшественников для синтеза NAD в нетрансфицированных клетках. Выход рибозида NAR из клеток в питательную среду был подтвержден методом ЯМР-спектрометрии. Однако механизм образования рибозидов NR и NAR в клетках человека на сегодняшний день неизвестен. В рамках данной работы мы подтвердили гипотезу о том, что цитозольные 5'-нуклеотидазы человека могут дефосфорилировать мононуклеотиды NMN и NAMN с образованием соответствующих рибозидов NR и NAR. Нами было показано, что 5'-нуклеотидазы человека CN-II и CN-III дефосфорилируют NMN и NAMN *in vitro* и *in vivo*.

Таким образом, мы впервые описали механизм образования рибозидов NR и NAR в клетках человека, а также продемонстрировали их способность выходить из одних клеток и выступать в роли предшественников синтеза NAD в других клетках.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 14-04-01765-а и 14-04-32117-мол_а).

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НЕСИММЕТРИЧНОГО ДИМЕТИЛГИДРАЗИНА НА СТРУКТУРУ СИНАПТОНЕМ-

НОГО КОМПЛЕКСА СПЕРМАТОЦИТОВ У МЫШЕЙ.
 © A. B. Ловинская,¹ С. Ж. Колумбаева,¹ С. К. Абильев,^{2,3}
 Т. М. Шалахметова,¹ О. Л. Коломиец.² ¹Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, аппалovinska@rambler.ru, ²Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва, и ³Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова.

Космическая индустрия, стремительно развивающаяся в последние десятилетия, способствует появлению новых экологически опасных факторов, негативно влияющих на состояние окружающей среды и здоровье человека. Результаты российских и казахстанских комплексных экспедиционных работ на местах падения остаточных частей космических ракет свидетельствуют о наличии компонента ракетного топлива несимметричного диметилгидразина (НДМГ, гептил) и продуктов его окисления в почве, воде и растениях в концентрациях, превышающих ПДК. Поэтому всестороннее изучение влияния данного ксенобиотика на организм представляет несомненную актуальность.

Целью настоящего исследования явилось изучение генотоксического действия НДМГ на синаптонемный комплекс (СК) половых клеток. Объектом исследования явились самцы лабораторных мышей линии BALB/cY^{wal} в возрасте 3 мес. Для интоксикации использовали водный раствор НДМГ, введение осуществляли внутрибрюшинно в дозах 6.6 и 66.0 мг/кг; время воздействия — 3 ч. Получение тотальных препаратов распластанных СК проводили по методу Наварро и соавторов (Navarro et al., 1981) с модификациями Коломиец и соавторов (Kolomiets et al., 2010). Проводили иммуноцитохимический анализ СК. СК и осевые элементы хромосом окрашивали с помощью кроличьих антител против белка SCP3 при разведении 1 : 250 (Abcam, Cambridge, Великобритания); гистон γH2AX выявляли с помощью мышиных антител против гистона γH2AX, 1 : 200 (Abcam, Cambridge, Великобритания); центромеры — с помощью IgG человека против белков кинетохора (CREST), 1 : 500 (Antibody Incorporated, California, США). В качестве вторичных антител использовали соответственно бычьи IgG против IgG кролика, коньюгированные с FITC, в разведении 1 : 400 (Invitrogen, США); козьи IgG против IgG человека, коньюгированные с Alexa Fluor 546, 1 : 200 (Invitrogen, США); козьи IgG против IgG мыши, коньюгированные с Alexa Fluor 546, 1 : 800 (Jackson, США).

У интактных животных сперматоциты с поврежденным СК составили 13.07 %. При этом были выявлены клетки с единичной фрагментацией СК (12.16 %), с изгибами и петлями СК (6.25 %), а также клетки с ассоциацией аутосом с XY-бивалентом (1.71 %). При введении животным НДМГ в дозах 6.6 и 66 мг/кг уровень клеток с поврежденным СК статистически значимо возрос по сравнению с контролем и составил соответственно вводимым дозам 74.19 и 80.91 %. Спектр наблюдаемых повреждений СК был достаточно широким. Имела место фрагментация СК (мейотическая «катастрофа» и единичная фрагментация), которая составила 38.67 и 51.45 %. Клетки с ассоциацией аутосом и полового бивалента составили 25.17 и 38.12 %, с изгибами и петлями СК — 53.17 и 60.42 % соответственно при минимальной и максимальной используемых дозах. НДМГ также вызывал нарушение формирования полового тельца (1.22 и 2.33 %), кольцевые СК (1.22 и 4.44 %) и десинапсис половых хромосом (2.18 и 7.24 %) соответственно при дозах

6.6 и 66 мг/кг. Аналогичные нарушения отсутствовали в половых клетках интактных животных.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено генотоксическое действие НДМГ на половые клетки мышей, проявившееся в изменении структуры синаптонемного комплекса сперматоцитов.

Работа выполнена в рамках проекта МОН РК ГР № 0112PK00580.

ВЛИЯНИЕ СТЕПЕНИ АГРЕГАЦИИ ХРОМАТИНА В ЯДРАХ ООЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА НА ИНИЦИАЦИЮ МЕЙОТИЧЕСКОГО СОЗРЕВАНИЯ И ФОРМИРОВАНИЕ МЕТАФАЗНЫХ ПЛАСТИНОК. © Д. Ф. Салимов,¹ А. Лопата,² Я. Нагаи,³ Т. В. Лисовская,¹ И. Г. Портнов,¹ А. Мива,³ Д. М. Отсуки.³ ¹Центр семейной медицины, Екатеринбург, Россия, dfsalimov@mail.ru, ²Отделение акушерства и гинекологии Королевского госпиталя, Мельбурн, Австралия, и ³Клиника Нагаи, Сайтама, Япония.

Одной из отличительных особенностей структурно-функциональной организации ядра гамет и ядра соматических клеток является формирование кариосферы: агрегация хроматина вокруг неактивного ядра (центрального тела). Кариосфера описана в ооцитах профазы мейоза для большого количества видов беспозвоночных, позвоночных животных и человека (Gruzova, Parfenov, 1993). Установлено, что после инициации мейотического созревания ооцитов человека хромосомы сохраняют агрегированное состояние вплоть до формирования веретена первого деления мейоза (Otsuki, 2007). По степени агрегации хроматина вокруг центрального тела кариосферы выделяют два типа кариосфер — с высокой (SN) и низкой (NSN) степенями конденсации хроматина (Combelles et al., 2002; Miyara et al., 2003). На сегодняшний день является актуальным изучение ультраструктуры и функций кариосферы.

Использовали GV-ооциты, полученные после контролируемой овариальной суперовуляции. Микрофотографии кариосфер двух групп GV-ооцитов (группа SN и группа NSN) оценивали в динамике с использованием рельефного и дифференциального интерференционного контрастов. Время инициации созревания — разрыва ядерной оболочки (GVBD) — и время завершения созревания — экструзии первого полярного тела (PB) — определяли методом цайтраферной микровидеосъемки (Primo Vision, Vitrolife, Швеция) с интервалом 5 мин. Биопсию веретена первого мейотического деления проводили с использованием лазера (OCTAX, MTG, Германия) и микроманипуляционной установки (Narishige, Япония) в культуральной среде Universal IVF Medium (MediCult, Ордигио, Дания) с добавлением 5 мкг/мл цитохалазина D (Sigma). Выделенные метафазные пластинки фиксировали на стеклах и исследовали на уровень анеупloidий методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) по 5 хромосомам (набор MultiVision PB, Vysis, США).

Исследовано 109 GV-ооцитов. Обнаружена зависимость между степенью агрегации хроматина на поверхности центрального тела кариосферы и способностью GV-ооцитов к созреванию в культуре *in vitro*. В ооцитах группы SN уровни GVBD и экструзии полярного тела составили 87.2 и 74.4 %, тогда как в группе NSN — 45.2 и 19.4 % соответственно ($P < 0.01$). В то же время в группе NSN-ооцитов, вступивших в созревание, среднее время

начала GVBD больше ($P < 0.01$), чем в группе SN (1146 ± 939 и 358 ± 408 мин соответственно). Генетическое исследование метафазных пластинок первого мейотического деления в группе ооцитов с низким уровнем конденсации хроматина выявило более высокий уровень анеупloidий.

Результаты свидетельствуют о взаимосвязи между степенью конденсации хроматина на центральном теле кариосферы и компетентностью к созреванию GV-ооцита. Обнаруженное формирование анеупloidных метафазных пластинок в NSN-ооцитах до расхождения хромосом может являться предвестником дальнейшего развития патологии гамет, при этом оценка уровня агрегации хромосом может быть одним из индикаторов качества GV-ооцитов во вспомогательных репродуктивных технологиях. Результаты позволяют в новом свете взглянуть на роль кариосферы в формировании веретена деления и механизмах созревания ооцита.

ИЗГИБАНИЕ ДНК В НУКЛЕОСОМЕ ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ ЧЕРЕДОВАНИЕМ ЕЕ ПЕНТАНУКЛЕОТИДОВ В А- И С-ФОРМАХ. © А. Н. Лучник. Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, atonement@bk.ru

Сегменты ДНК в А-форме, помещенные между сегментами в В-форме (либо С-форме), придают кривизну (изгиб) молекуле вследствие наклона пар оснований в А-форме (inclination) на $19\text{--}23^\circ$ по отношению к ее оси. Этот наклон жестко связан с клиновидным углом (roll) между парами оснований в А-форме ($19\text{--}23^\circ$ на пять пар оснований). Кривизна создается именно за счет клиновидного угла схождения пар оснований, направленного внутрь изгиба 15-членника в форме В/A/B (или в С/A/C). Все пары оснований на стыках A/B (или A/C) и внутри сегментов остаются параллельными друг другу. Однако если посмотреть на молекулу под углом 90° , смещаясь по часовой стрелке или против нее вокруг оси ДНК, можно увидеть клиновидный угол в А-сегменте, где пары оснований уже не выглядят параллельными. Такой парадокс возникает вследствие трехмерной структуры молекулы ДНК, которая может быть лучше осознана, если изобразить молекулу на плоскости в двух указанных проекциях, различающихся углом зрения на 90° .

А- и В-формы ДНК существуют в растворах с низкой ионной силой, а А- и С-формы существуют в растворах с высокой ионной силой (Luchnik, 2014). Также А- и С-формы существуют в нуклеосомах вследствие нейтрализации фосфатов ДНК аминогруппами гистонов с эффективностью, равной 1.6—1.9 М NaCl (Luchnik, 2014). То, что чередующиеся сегменты ДНК имеют длину 5 пар оснований (п. о.), подробно обсуждается в данном докладе. Коротко говоря, это связано с тем, что именно такая конфигурация ДНК является наиболее выгодной с точки зрения минимальной энергии суммы внутренних ковалентных связей в дуплексе ДНК. Так, в низкой ионной силе ДНК состоит из чередующихся сегментов в В-форме (10 п. о. на виток) и А-форме (11 п. о. на виток). Таким образом, в этих условиях ДНК имеет равновесный шаг 10.5 п. о. на виток (5 п. о. на полвитка в В-форме и 5.5 п. о. на полвитка в А-форме).

Замыкание коротких фрагментов ДНК в кольцо вследствие ее тепловых флуктуаций было зафиксировано ДНК-лигазой, добавленной в раствор (Cloutier, Widom, 2005). Вероятность замыкания в кольцо фрагментов, име-

ющих длину, кратную 10.5, умноженную на целое число >8 или <12 , была наивысшей при значениях $9 \cdot 10.5 = 94.5$ и $10 \cdot 10.5 = 105$. Однако при удлинении или укорочении этих фрагментов на 5 п. о. вероятность замыкания была в 25—50 раз ниже, что ясно говорит о том, что динамическое равновесие достигается при равном числе 5-членных сегментов в А- и В-формах.

Таким образом, в низкой ионной силе фрагмент 94 п. о. состоит из 9 пентануклеотидов в В-форме (5 п. о. на полвитка) и 9 пентануклеотидов в А-форме (5.5 п. о. на полвитка). В результате $(5.0 \cdot 9) + (5.5 \cdot 9) = 94.5$ п. о., что точно совпадает с экспериментом.

В высокой ионной силе фрагмент 90 п. о. состоит из 9 пентануклеотидов в С-форме (4.5 п. о. на полвитка) и 9 пентануклеотидов в А-форме (5.5 п. о. на полвитка). В результате $(4.5 \cdot 9) + (5.5 \cdot 9) = 90$ п. о., что является размером кольца, соответствующего кривизне ДНК в нуклеосоме.

Другие многочисленные эксперименты, включая наши собственные, обсуждаемые в данном докладе, говорят о равновесной конфигурации свободной ДНК, состоящей из равного количества чередующихся 5-членников в В(С)- и А-формах в любых гидрофильных условиях. Эта равновесная конфигурация имеет свободную энергию $< k_B T$ (0.6 ккал/М). Скорость переходов (интерконверсии) А-сегментов из формы roll+ ($+19\text{--}23^\circ$ на 5 п. о.) в форму roll- ($-19\text{--}23^\circ$ на 5 п. о.) чрезвычайно низка и находится в интервале 1—600 с, что связано с чрезвычайно низкой энергией интерконверсии (ниже энергии тепловых флуктуаций).

В результате расчетная кривизна свободной ДНК (перsistентная длина) при замыкании ее в кольцо в высокой ионной силе составляет 85—90 п. о. Именно такая кривизна была обнаружена в результате рентгеноструктурного анализа нуклеосом многочисленными авторами.

Таким образом, конфигурация свободной ДНК диктует размеры и форму нуклеосомы, а не наоборот, как до сих пор полагали многочисленные авторы.

КОРРЕЛЯЦИЯ ЧИСЛА ГЕПАТОЦИТОВ, ИХ СУХОЙ МАССЫ И ПЛОИДНОСТИ С АБСОЛЮТНОЙ И ОТНОСИТЕЛЬНОЙ МАССОЙ ПЕЧЕНИ У КРЫС. © Л. Лю, Е. В. Байдюк, Н. Н. Безбородкина, А. Ю. Честнова, Г. И. Штейн, Б. Н. Кудрявцев. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Изменчивость различных признаков и свойств является характерной особенностью всех живых организмов. Под изменчивостью организмов чаще всего понимают индивидуальную изменчивость, которая может быть обусловлена как наследственными, так и ненаследственными изменениями — модификациями. Индивидуальная изменчивость у человека и животных затрагивает множество анатомических, физиологических и биохимических признаков, но механизмы, лежащие в ее основе, остаются, как правило, неизвестными. Одними из наиболее бросающихся в глаза признаков являются те, которые связаны с размерами тела человека и отдельных его органов. Однако если о вариабельности роста и массы тела человека и изменениях этих показателей в разные периоды его жизни имеется большое количество данных, то об индивидуальной вариабельности размеров отдельных органов человека известно гораздо меньше. И совсем мало изве-

стно о причинах этой вариабельности и ее функциональном значении.

Печень выполняет огромное число различных функций в организме млекопитающих, являясь своего рода химической лабораторией. Показано, что масса печени взрослого человека колеблется от 1087 до 2584 г (Müller et al., 2011), а колебания относительной массы печени, например, у кролика достигают 5 раз (Уильямс, 1960). Масса этого органа, как и других, зависит прежде всего от размера клеток и их количества. В настоящее время неизвестно, связаны ли индивидуальные колебания абсолютной и относительной масс печени у человека и животных с изменением числа, пloidности и массы отдельных гепатоцитов в этом органе.

Исследование проведено на 83 взрослых крысах-самцах (Wistar), масса тела которых варьировала от 168 до 390 г. Основной эксперимент проведен на двух группах крыс (по 5 животных в каждой), масса тела которых была одинаковой (310 ± 10 и 295 ± 8 г). Однако абсолютная и относительная массы печени в одной группе крыс превышали эти показатели в другой группе на 31.8 ($P < 0.0001$) и 34.6 ($P < 0.0001$) % соответственно. Для определения пloidности гепатоцитов, изолированных из печени и окрашенных по Фельгену, использовали анализатор изображений ($\lambda = 546$ нм), сухую массу клеток измеряли с помощью интерференционного микроскопа, а долю паренхимы определяли на срезах ткани печени, окрашенных пикросириусом. Число гепатоцитов в печени определяли по формуле $N = P \cdot R \cdot f/M$, где N — количество клеток, P — сырая масса печени, г, R — доля паренхимы ($R = 1 - Q$), Q — доля соединительной ткани, f — коэффициент перехода от сырой массы миокарда к сухой, составляющий, по нашим данным, 0.273, M — средняя сухая масса 1 гепатоцита, пг (10^{-12} г).

В результате проведенного исследования показано: 1) с увеличением массы тела крыс абсолютная масса печени возрастает ($r = 0.84$, $P < 0.00001$), а ее относительная масса снижается ($r = -0.35$, $P < 0.001$); 2) сухая масса гепатоцита в группе крыс с более высокими значениями абсолютной и относительной массы печени в среднем на 30.6 % больше ($P < 0.00001$), чем в группе крыс с низкими значениями абсолютной и относительной массы печени; 3) количество гепатоцитов в печени взрослых крыс с высокими и низкими значениями абсолютной и относительной масс печени одинаково и составляет 1.76—1.77 млрд клеток; 4) несмотря на значительные различия абсолютной и относительной масс печени крыс, доля гепатоцитов различных классов пloidности и средние уровни их пloidности не различались.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 14-04-00730-а и 14-04-32378-мол_а).

ЭКСПРЕССИЯ НУКЛЕОСТЕМИНА В ПРОЦЕССЕ РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ IN SITU КЛЕТОК ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ ГЛАЗА ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ СЕТЧАТКИ У ВЗРОСЛОГО ТРИТОНА. © Ю. В. Маркитанова, П. П. Авдонин, Э. Н. Григорян. Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, yuliya.mark@gmail.com

Белки ядрышка вовлечены в механизмы регуляции клеточных процессов в разных биологических системах.

Динамическое состояние ядрышка является одним из критериев изменения морфологии клеток в условиях стресса и патологии, что связано с высокой подвижностью и способностью белков ядрышка к миграции в нуклеоплазму. Интерес к исследованию при регенерации сетчатки низших позвоночных роли белка ядрышка нуклеостемина помимо этого свойства обусловлен высоким уровнем его экспрессии в малодифференцированных и пролиферирующих клетках. Функции нуклеостемина связаны с биогенезом рибосом, регуляцией клеточного цикла и апоптоза. Изменение характера экспрессии этого гена позволяет рассматривать его в качестве маркера наряду с другими для оценки степени понижения дифференцировки клетки.

В настоящей работе на модели регенерации сетчатки из дифференцированных клеток ретинального пигментного эпителия (РПЭ) взрослого тритона (*Urodesa*) вида *Pleurodeles waltl* исследован характер экспрессии нуклеостемина с применением методов ПЦР и иммунохимии в сопоставлении с изменением морфологии клеток, оцениваемой методами цитологии, синтеза общей РНК, определяемого по включению ^3H -уридуна. Ядро визуализировали с помощью красителя Hoechst 33342, а ядерную мемброну — с помощью антител к ламину B. Дифференцированные клетки РПЭ взрослого тритона являются источником регенерации сетчатки, после удаления которой РПЭ подвергается конверсии. В основе этого процесса лежит репрограммирование генома клеток РПЭ, в результате чего они теряют черты исходной дифференцировки и через транзитную популяцию нейробластов образуют все типы нейронов и глии сетчатки. Мы показали, что процесс конверсии клеток РПЭ и регенерации сетчатки сопровождается интенсификацией синтеза и созревания РНК, в частности рРНК. В клетках раннего регенерата сетчатки тритона *Pl. waltl* обнаружены изменения ядерно-цитоплазматического соотношения, увеличение числа и размеров ядрышек и количества синтезируемой РНК. Наличие мРНК и белка нуклеостемина выявлено в дифференцированных клетках нативного РПЭ, а также в клетках пигментного эпителия радужки и эпителия хрусталика. Ранее на модели регенерации хрусталика тритона вида *Cynops pyrrhogaster* доказано участие нуклеостемина в дедифференцировке клеток дорсальной области радужки, являющихся источником регенерации хрусталика у взрослых хвостатых амфибий (Maki et al., 2007). Динамика распределения мРНК гена нуклеостемина у тритона *Pl. waltl*, зарегистрированная нами с помощью методов ПЦР, свидетельствует о возрастании транскрипционной активности гена в регенерирующем сетчатке, что коррелирует с морфологическими изменениями в ядре клетки. С применением конфокальной лазерной сканирующей микроскопии белок обнаружен в ядрышке и нуклеоплазме клеток регенерата сетчатки с преимущественным наложением в ядрышке дедифференцирующихся клеток РПЭ и нейробластах. На поздних стадиях регенерации сетчатки белок выявлен преимущественно в нуклеоплазме и у ядерной мембранны нейронов. Присутствие в дифференцированных клетках РПЭ, изменение характера экспрессии и локализации нуклеостемина после удаления сетчатки являются пререквизитом способности клеток РПЭ к конверсии (репрограммированию) и указывает на участие нуклеостемина в регенерации сетчатки тритона.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской фонда фундаментальных исследований (проект

ты 14-04-00184 и 12-04-00186) и программы президиума РАН «Живая природа».

НАРУШЕНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ МАКРОНУКЛЕУСА ИНФУЗОРИИ *PARAMECIUM MULTIMICRONUCLEATUM*, ЗАРАЖЕННОГО ПОДВИЖНЫМ ЭНДОНУКЛЕОБИОНТОМ *TRICHORICKETTSIA MOBILIS*. © Т. И. Миронов, К. А. Бенкен, Е. В. Сабанеева. С.-Петербургский государственный университет.

В макронуклеусах (Ma) некоторых клонов инфузории *Paramecium multimicronucleatum* обитает подвижная бактерия *Trichorickettsia mobilis*, активно перемещающаяся внутри ядра благодаря наличию многочисленных жгутиков. Морфология Ma зараженных клеток была исследована с помощью световой (контраст Номарского и окрашивание по Фельгену), конфокальной лазерной сканирующей (окрашивание DAPI и флуоресцентно меченным фаллоидином) и трансмиссионной электронной микроскопии. В случае использования конфокальной лазерной сканирующей микроскопии бактерии в ядре выявляли методом флуоресцентной гибридизации *in situ* с видоспецифичным зондом. Присутствие подвижных бактерий в Ma приводит к образованию в нем лакун, свободных от хроматина и ядрышек. В то же время бактерии могут находиться и вне полостей Ma, причем часто вблизи бактерий наблюдаются структуры, которые можно трактовать как транскрипционные единицы, обычно незаметные в незараженных Ma. Обработка клеток флуоресцентно меченным фаллоидином продемонстрировала изменение характера распределения актина в зараженных ядрах, в целом соответствующее картинам, полученным с помощью окрашивания DAPI. Наши данные свидетельствуют о локальной разборке актинового цитоскелета макронуклеуса, вызванной присутствием подвижных бактерий. Наличие полостей в Ma наблюдалось ранее исключительно в ядрах инфузории *P. caudatum*, инфицированных бактериями *Nonospora macronucleata*, и нехарактерно для заражения Ma парамеций бактериями рода *Holospora*.

ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РНК-СВЯЗЫВАЮЩЕГО КРАСИТЕЛЯ ПИРОНИНА У ДЛЯ ЛОКАЛИЗАЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА РНК В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ МЕТОДАМИ СОВРЕМЕННОЙ МИКРОСКОПИИ. © А. А. Миронова,¹ А. А. Квят,^{1,2} О. В. Зацепина.¹ ¹Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, и ²Висконсинский университет в Мадисоне, Висконсин, США, zatsepina_olga@mail.ru

Пиронин Y (PY) относится к одним из наиболее известных РНК-связывающих красителей, который широко используется в проточной цитофлуориметрии. Однако область его применения для выявления РНК методами микроскопии остается пока весьма ограниченной, что связано с отсутствием общепринятых подходов для окрашивания клеток и условий их микроскопического анализа. В настоящей работе на примере клеток HeLa мы оптимизировали условия окрашивания клеток PY, которые позволяют выявлять РНК методами флуоресцентной и конфокальной лазерной микроскопии. Согласно нашим результатам, оптимальным фиксатором для выявления

внутриклеточной РНК являются смесь ледяной уксусной кислоты и метанола и низкая концентрация красителя (0.25—0.5 мкг/мл), которая позволяет предотвратить его связывание с ДНК вне зависимости от сроков инкубации с красителем. Учитывая, что связанный PY легко отмывается в буферах (например, в стандартном фосфатном буфере), а его флуоресценция гасится при помещении клеток в заливочную среду (например, в Мовиол), мы анализировали клетки в присутствии красителя, используя конфокальный лазерный микроскоп LSM510 DuoMeta (Carl Zeiss, Германия). Флуоресценцию возбуждали лазером с длиной волны 514 нм, регистрацию изображений производили с помощью длинноволнового пропускающего фильтра LP530. В предлагаемых условиях PY может быть также использован для сравнительного количественного анализа содержания РНК в разных компартиментах клетки, включая ядрышки, а также в разных образцах. Количественная оценка содержания РНК предполагает оценку интенсивности флуоресценции PY, которую можно производить, используя программное обеспечение ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/download.html>). Возможность применения PY для оценки количественного содержания РНК была подтверждена на клетках HeLa с помощью их обработки РНКазой A, а также путем инкубации клеток с ингибитором синтеза РНК актиномицином Д (0.1 мкг/мл, 15 мин—4 ч). При частичном (на короткие сроки обработки) и полном (через 1 ч) подавлении синтеза РНК актиномицином Д содержание ядрышковой РНК достоверно уменьшалось в хорошем соответствии с биохимическими данными о влиянии актиномицина Д на синтез РНК в клетках млекопитающих (Perry, Kelley, 1970; Yung et al., 1990). В работе обсуждаются факторы, влияющие на точность измерений содержания РНК в ядрышках, включая стабильность работы лазера, концентрацию красителя, плотность посадки клеток на субстрате и способы математической обработки компьютерных изображений. Согласно нашим оценкам, ошибка определения РНК в ядрышках и клетках с помощью PY и конфокальной микроскопии составляет 20—30 %. Разработанный подход может быть использован для анализа РНК в объектах, труднодоступных или недоступных для биохимического анализа.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект 14-34-00033).

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ СЕМЕННИКОВ, СПЕРМАТО- И СПЕРМИОГЕНЕЗ У МОРСКОГО МОЛЛЮСКА *LITTORINA SAXATILIS*. © Н. А. Михайлова,^{1,2} С. Ю. Демин,¹ А. И. Гранович.² ¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, natmik@mail.ru, и ²Биологический факультет С.-Петербургского государственного университета.

С помощью прижизненных наблюдений методом DIC впервые проведено детальное описание структурной организации гонад половозрелых самцов моллюска *Littorina saxatilis* (Olivii, 1792). Непарный семенник располагается вдоль протоков печени и имеет дольчатое строение. Показано, что оvoidные дольки, или лобулы, гонады размером 0.2—0.4 мм, собираются в более крупные доли (1—2 мм). Дольчатые структуры пронизаны лобулярными канальцами, через которые выводятся созревающие сперматозоиды в центральную полость семенника. По-

лость гонады переходит в семяпровод и семявыносящий канал. Лобулы армированы трехмерной сетью из удлиненных клеток с мелкими ядрами и многочисленными пучками микрофиламентов в цитоплазме. Доли зрелой гонады заполнены цистами, содержащими или сперматогонии, или сперматоциты, или дифференцирующиеся спермии. Такой тип организации семенников *L. saxatilis* нами был определен и назван лобулярно-цистным.

Дифференцировка цист *L. saxatilis* сходна с аналогичным процессом, протекающим в семенниках *Drosophila melanogaster*, что позволило использовать терминологический аппарат, хорошо разработанный для этого модельного объекта (http://flybase.org/static_pages/termlink.html).

По нашим данным, развитие цист у *L. saxatilis* начинается с формирования гониобластной цисты, которая состоит из цистной клетки соматического происхождения и первичного сперматогония. В ходе дифференцировки первичный сперматогоний такой цисты претерпевает ряд последовательных митотических делений, формируя многоклеточную сперматогониальную цисту. Завершение предмейотического раунда репликации ДНК формирует цисты интерфазных первичных сперматоцитов. Вступление клеток в мейоз приводит к появлению сначала мейотических цист первичных сперматоцитов, затем интерфазных и мейотических цист вторичных сперматоцитов. По завершении мейоза образуются сперматидные цисты, в которых осуществляются многоэтапные процессы спермато- и спермиогенеза. Границей между этими генезисами служит начало процесса элонгации ядер сперматид. С этого момента, в том числе и по ультраструктурным данным (Buckland-Nicks, 1973), принято отсчитывать наступление спермиогенеза у липторинид. Дискриминацию этапов созревания спермии мы проводили на основании паттернов ядерного хроматина, используя как прижизненные наблюдения, так и цитохимические исследования спредов сперматидных цист, полученных методом высокого давления (250 кг/см²). По этим характеристикам мы выделили пять стадий сперматогенеза и семь стадий спермиогенеза. Полученные данные свидетельствуют как минимум о шести циклах деконденсации—конденсации хроматина в ходе созревания сперматозоидов. Последние этапы созревания спермы проходят вне цист, в полости гонады и половых протоках. Установлено, что цисты с деградирующими апоптотическими ядрами выбрасываются в полость гонады вместе со спермой. Такие цисты ранее получили название парасперматозоидов (Reid, 1996), им отводится питающая функция, важная для созревания нормальной спермы.

Исследование проведено с использованием оборудования ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» С.-Петербургского государственного университета и при финансовой поддержке программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 14-04-10195-к, 12-04-00312-а).

ИЗУЧЕНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ БЕЛКОВ ЯДЕРНОГО МАТРИКСА В СОСТАВЕ ОКОЛОЯДРЫШКОВОГО ХРОМАТИНА. © М. И. Мурашева, Ю. С. Ченцов. Кафедра клеточной биологии и гистологии биологического факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, marinak-@mail.ru

Для регуляции процессов репликации и транскрипции хроматина в ядре требуется каркасная система, которая будет служить для объединения всех ядерных компонентов — хроматина, ядрышка и ядерной оболочки. Такой структурой является ядерный белковый матрикс (ЯБМ) — гетерогенный компонент, который выявляется после экстракции из ядра ДНК, РНК и всех гистонов (Zbarsky, Georgiev, 1959; Georgiev, Chentsov, 1962). В структурном отношении ЯБМ представлен внутриядерной белковой сетью, остаточными ядрышками и ламиной и играет большое значение в пространственной организации синтеза ДНК и РНК в интерфазном ядре (Iarovaia, Razin, 1983). Существуют данные о том, что в состав ЯБМ входят белки, участвующие в процессах репликации и транскрипции, в формировании различных уровней организации ДНК, играющих важную роль в регуляции клеточного ответа при активации онкогеновых факторов и т. д. (Grisendi et al., 2005; Naoe et al., 2006; Yung, 2007). Оказалось, что ЯБМ млекопитающих содержит около 300 белков, но лишь некоторые из них выделены и охарактеризованы (Mika, Rost, 2005). В нашей работе использованы поликлональные антитела к B23 и фибрillарину, локализующимся, по данным литературы, исключительно в интерфазных ядрышках, а также аутоиммунные антитела к белкам с мол. массами 27, 38, 40, 50 и 65 кДа, полученным из сывороток больных аутоиммунными заболеваниями. Задачей работы являлось описать локализацию белков в интерфазных ядрах необработанных клеток и в ЯБМ, используя иммунофлуоресцентные методы. Объектом исследования служили клетки культуры СПЭВ (почки эмбриона свиньи). Сыворотки были получены от больных аутоиммунными заболеваниями из Института ревматологии (Санкт-Петербург). Для выявления белков ядерного матрикса из клеток экстрагировали ДНК, РНК и все гистоны. В нашей работе на интактных интерфазных клетках с помощью поликлональных антител к белкам фибрillарину и B23 было показано, что оба белка в ядре равномерно распределяются по всему ядрышку. Вместе с тем в ЯБМ с помощью антител к белку фибрillарину окрашивается все остаточное ядрышко, а с помощью антител к B23 интенсивно окрашивается лишь его периферия, там, где до экстракции ДНК находился околяядрышковый хроматин. Возможно, что локализация этих белков в остаточном ядрышке тесно связана с различиями в функциях. Так, фибрillарин связан с препроцессингом pРНК, а B23, называемый многофункциональным, сигнальным белком, отвечает за многие регуляторные процессы, протекающие в геноме клеток. В то время как функции белков ядрышек вызывают большой интерес исследователей, неядрышковые белки изучены мало (Earnshaw, Bernat, 1991; Dundr et al., 1997). В необработанных клетках все изученные нами белки с мол. массами 27, 38, 40, 50 и 65 кДа локализованы на периферии интерфазных ядрышек в зоне околяядрышкового хроматина, а также в кариоплазме в виде небольших скоплений или гранул. В ЯБМ белки с мол. массами 27 и 38 кДа локализуются только на периферии остаточных ядрышек там, где до экстракции ДНК находился околяядрышковый хроматин. Белки с мол. массами 40, 50 и 65 кДа не только содержатся на периферии остаточных ядрышек, но и образуют внутреннюю белковую сеть матрикса. Следует отметить, что все исследуемые белки имеют колокализацию в периферической зоне остаточных ядрышек ЯБМ, где до экстракции находился околяядрышковый хроматин.

Таким образом, можно сделать заключение о том, что белки ЯБМ с мол. массами 27, 38, 40, 50 и 65 кДа и белок B23 входят в состав окологрышкового хроматина, который является особым хромосомным гетерохроматиновым доменом, связанным не только с синтезом рибосомных РНК.

ПРОБЛЕМЫ МИКРОХИРУРГИИ ЕДИНИЧНОЙ КЛЕТКИ И ТРАНСПЛАНТАЦИИ ЯДЕР. ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ. © В. А. Никитин,^{1,2} Е. Е. Фесенко.¹

¹ Институт биофизики клетки РАН, vnikitin2001@rambler.ru, и ² Институт биологического приборостроения РАН, Пущино, Московская обл.

Проблема реконструкции клетки методами клеточной инженерии — одна из центральных в биологии, так как позволяет подойти к решению ряда принципиальных вопросов биологии развития и молекулярной биологии, активно вмешиваться в развитие клеток, органов и тканей. Одно из наиболее важных условий эффективной и успешной работы с единичной клеткой — необходимость свести к минимуму любые ее повреждения на всех этапах манипуляций. В настоящей работе особое внимание уделяется анализу возможных источников повреждений клеток и органелл при пересадке ядер и созданию методов и приборов, обеспечивающих сведение повреждений при микрохирургии к минимуму. Показано, что для успеха операции пересадки ядер важен правильный выбор места прокола мембранны единичной клетки. Установлено оптимальное время микрохирургических манипуляций. Создана специальная микропипетка для пересадки ядер, позволяющая легко пройти через zona pellucida при клонировании эмбрионов, не деформируя всю клетку. Перфорации с помощью такой микропипетки получаются щелевыми и быстро репарируемыми. Создана также специальная микрокамера открытого типа, позволившая работать с микроинструментами прямого типа при максимальном увеличении оптического микроскопа. Разработан и успешно применен новый метод удерживания клетки, оптимизирующий этот процесс за счет использования капиллярных сил микроприсоски-держателя. Представлена также созданная нами особая микропипетка, капсула-держатель, с помощью которой можно фиксировать ранний эмбрион вообще без использования отрицательного давления.

УЧАСТИЕ АЛЬФА-АКТИНИНА 4 В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ NF-κB И P53. © Н. В. Панюшев,^{1,2} Е. В. Ломерт,^{1,2} В. Ю. Аксенова,^{1,2} Д. Г. Гентлер.^{1,2} ¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, vasilisina@gmail.com, dtentler@mail.ru, и ² Лаборатория молекулярной фармакологии и клеточной биотехнологии С.-Петербургского технологического института (Технического университета).

Альфа-актинин 4 (Actn4) — один из ключевых белков актинового цитоскелета, который участвует в формировании трехмерной организации актиновых фибрill и образовании фокальных контактов. Кроме того, Actn4 способен мигрировать в ядро, где он взаимодействует со многими транскрипционными факторами, ядерными рецепторами и белками семейства hnRNP. Изменение уровня экспрессии Actn4 наблюдается в некоторых типах опухолей, что, по всей видимости, опосредовано его влияни-

ем на скорость пролиферации и миграции клеток. На сегодняшний день есть данные, свидетельствующие о том, что изменение уровня экспрессии Actn4 влияет на экспрессию ряда NF-κB-зависимых генов (*MMP3* и *MMP1*). Показано, что активация NF-κB может выполнять при этом двоякую роль в развитии опухолевого процесса. С одной стороны, NF-κB как ключевой элемент иммунной системы способствует элиминации трансформированных клеток через активацию цитотоксических клеток иммунной системы (Disis, 2010). С другой стороны, постоянная активация NF-κB может приводить к усилению экспрессии антиапоптотических генов и способствовать, таким образом, выживанию трансформированных клеток (Hoesel, Schmid, 2013). Кроме того, активация NF-κB может стимулировать распространение опухоли через регуляцию эпителиально-мезенхимального перехода и метастазирования, которые часто ассоциированы с усилением экспрессии генов, кодирующих матриксы металлопротеиназы (Huber et al., 2004).

Таким образом, чтобы приблизиться к пониманию того, какую роль Actn4 выполняет в процессе онкогенеза, участвуя в активации NF-κB, мы поставили ряд задач. 1. Выяснить, является ли коактивация NF-κB следствием прямого взаимодействия Actn4 и p65/RelA на промоторах регулируемых генов. Проведено выделение комплексов RelA/p65 с хроматином (участками промоторов NF-κB-регулируемых генов — *MMP-3*, *TNC* и *BAX*), определено присутствие в них RelA/p65, Actn4 и ДНК. 2. Определить специфичность связывания Actn4 с промоторами, содержащими последовательность κB, и влияния на NF-κB-зависимую транскрипцию. Получена репортерная конструкция на основе гена *EGFP* под контролем промотора гена *MMP3* и создана постоянная клеточная линия, содержащая данную конструкцию. По уровню флуоресценции белка EGFP определяли участие Actn4 в коактивации NF-κB-зависимой транскрипции гена *MMP3*. 3. Так как активация NF-κB во многом антагонистична активации онкосупрессора p53, мы решили определить уровень экспрессии p53-зависимых генов, самого p53 и его E3-убиквитинлигазы MDM2 в условиях сверхэкспрессии NF-κB и сверхэкспрессии NF-κB в комбинации со сверхэкспрессией или подавлением Actn4.

Решение поставленных задач позволит приблизить наше понимание того, каковы истинные функции Actn4 в тех условиях, когда его сверхэкспрессия приводит к изменению экспрессии NF-κB-зависимых генов, а именно того, выполняет он функцию положительного или негативного фактора в процессе опухолеобразования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской фонда фундаментальных исследований (проекты 12-04-32194-mol.a, 14-04-01910-а и 13-04-00497-а) и программы по привлечению ведущих ученых в российские вузы (11.G34.31.0069 и 14.B25.310013).

ПРОБЛЕМА ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ. © О. И. Подгорная. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, oprodg@yahoo.com

Факт присутствия в жидкостях эукариот циркулирующей ДНК (цкДНК) документирован давно, однако проблема сильно дискредитирована политическими обстоятельствами. В последнее время после чтения геномов стало возможным освещение проблемы цкДНК с но-

вой стороны. Источником цкДНК в организме являются микровезикулы активированных клеток, экзосомы покоящихся клеток и непрерывно идущий апоптоз, который усиливается при патологических состояниях. В цкДНК выделяют высокомолекулярную фракцию (около 7 т. п. н.) и низкомолекулярную, или нуклеосомную, фракцию (около 200 п. н.). ЦкДНК защищена от деградации белково-липидным комплексом. При индуцированном апоптозе цкДНК эндотелиальных клеток обеднена LINE и центромерными tandemными повторами (ТП), обогащена Alu и перицентромерными ТП, что видно как по результатам секвенирования, так и при флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с помощью зондов цкДНК на метафазных пластинках. Та же тенденция наблюдается и в плазме крови здоровых доноров — обогащение Alu (повторы типа SINE) и обеднение LINE. Из клеток, трансформированных генно-инженерной конструкцией с экспрессией хитинсвязывающего домена, выделили клеточную мембрану без разрушения ядра. В чистой мембранный фракции после секвенирования доминирует ДНК перицентромерных ТП размером около 7 т. п. н. в комплексе со специальной формой РНК-полимеразы II. Гены также присутствуют в цкДНК. В плазме крови больных лейкемией идентифицирован мутантный ген *ras*, который и отвечает за раковое состояние. Весь экзом человека в процессе химического лечения рака проанализирован после секвенирования. ЦкДНК плазмы крови сравнили с ДНК раковых клеток, а также оба образца с ДНК клеток зародышевой линии. Так выявили все мутации в кодирующих последовательностях. Селективное давление химического воздействия на раковые клетки приводит к мутациям и находит свое отражение в цкДНК. Секвенирование цкДНК плазмы крови оказалось достоверным неинвазивным методом выявления мутаций и прогноза лечения. Присутствие в цкДНК конкретных классов повторяющихся последовательностей, которые маркируют и, вероятно, организуют ландшафт эу- или гетерохроматиновых участков генома, позволяет решить один из ключевых нерешенных вопросов теории эволюции — появление глобальных эволюционных новшеств, не связанных с точечными мутациями. Повторы цкДНК имеют высокий шанс быть захваченными в процессе опосредованного сперматозоидами переноса ДНК. Метод опосредованного сперматозоидами переноса ДНК рутинно используется в ветеринарии для получения трансгенных животных. Показано, что конструкция на основе плазмидной ДНК с вирусным LTR и геном β -галактозидазы под промотором гена ростового фактора быка, инкубированная со сперматозоидами, приводит к трансформации 20 % потомства кролика; доля трансформированного потомства возрастает до 100 % при инкубации плазмидной ДНК с DMSO и нагревании смеси. При неблагоприятных условиях возможны повышение количества отдельных классов повторов в цкДНК, их захват сперматозоидами и «трансформация» всего помета регуляторными элементами, что приводит к более эффективной работе всего генома.

ИСКУССТВЕННАЯ ХРОМОСОМА ЧЕЛОВЕКА КАК ВЕКТОР ДЛЯ ГЕНОТЕРАПЕТИЧЕСКИХ ЦЕЛЕЙ.
 © С. В. Пономарцев,^{1,2} М. А. Лисковых,^{1—3} В. Л. Ларионов,³ А. М. Кондрашкина,^{1,2} Н. Ю. Куприна,³ Е. Попова,⁴ Н. В. Аленина,⁴ М. Бадер,⁴ А. Н. Томилин.^{1,2} ¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ²Центр исследований,

образования и инноваций в области стволовых клеток СколТех, Сколково, PonomartsevSV@gmail.com, ³Национальный институт здоровья, Национальный институт рака, Бетесда, США, и ⁴Центр молекулярной медицины им. Макса Дельбрюка, Берлин, Германия.

Искусственная хромосома человека (ИХЧ) — удобный вектор для доставки генов в клетку. По сравнению с другими векторными системами, такими как вирусные, ИХЧ обладает рядом преимуществ, среди которых неинвазивность в геном, возможность переноса генетических конструкций большой длины и стабильность в геноме клетки хозяина.

Нашей группой были получены мышиные стволовые клетки, содержащие ИХЧ с геном флуоресцентного зеленого белка (GFP). Автономность ИХЧ в геноме эмбриональных стволовых клеток мыши была показана методом FISH. Нами показано также, что ИХЧ в геноме мышиных эмбриональных клеток не влияет на плюрипотентные свойства этих клеток, что было доказано иммуноцитохимической окраской на маркеры плюрипотентности, такие как SSEA1, Oct4 и Nanog, а также проверкой клеток на способность дифференцироваться в разные клеточные типы в условиях *in vitro* и формировать тератомы *in vivo*. Более того, путем инъекции полученных клеток в бластоциту нами были получены химерные мыши, 20—30 % клеток которых содержали ИХЧ и экспрессировали ген интереса (GFP). Таким образом, нами было показано, что ИХЧ не нарушает процесса эмбрионального развития и экспрессия гена интереса не подвергается глушению в процессе дифференцировки клеток во время эмбриогенеза.

На следующем этапе работы нами была поставлена задача применить ИХЧ в генотерапевтических целях. Модельными объектами стали мыши, мутантные по генам дисферлина (модель мышечной дистрофии), гамма-субъединицы рецептора интерлейкина-2 (модель тяжелого врожденного иммунодефицита) и фактора свертываемости крови 8 (модель гемофилии). На данном этапе исследования нами получены генотерапевтические ИХЧ с генами дисферлина и гамма-субъединицы рецептора интерлейкина-2, а также членочный вектор с геном свертываемости крови 8, который будет встроен в ИХЧ. Выделены фибробlastы из мутантных мышей, которые будут использованы для получения индуцированных плюрипотентных стволовых (ИПС) клеток, в которые в свою очередь планируется перенос генотерапевтических ИХЧ. В итоге полученные ИПС-клетки, содержащие генотерапевтические ИХЧ, планируется вводить мутантным мышам с целью получения терапевтических эффектов.

Работа проводится при финансовой поддержке фонда СколТех.

ОРГАНИЗАЦИЯ ДНК В ХРОМАТИНОВЫХ ТЕЛЬЦАХ МАКРОНУКЛЕУСА ИНФУЗОРИИ *DIDINUM NASUTUM*. © В. И. Попенко,¹ А. А. Потехин,² Б. П. Караджян,³ О. Г. Леонова.¹ ¹Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, ropenko@eimb.ru, ²С.-Петербургский государственный университет и ³Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Инфузории содержат в каждой клетке ядра двух типов — транскрипционно активные, полиплоидные соматические ядра (макронуклеусы) и неактивные генератив-

ные ядра (микронуклеусы). Все исследованные к настоящему времени инфузории можно разделить на две большие группы: виды, где геном соматических ядер (макронуклеусов) представлен молекулами ДНК генного размера (0.5—25 т. п. н.), и с ДНК размером в несколько сотен т. п. н. (ДНК субхромосомного размера). Каждая такая молекула ДНК может рассматриваться как мини-хромосома. Размер молекул ДНК макронуклеуса является важной характеристикой вида, которая в большой степени определяет как структуру высших уровней организации хроматина, так и пространственную организацию хроматина в ядре.

Для определения размера молекул ДНК макронуклеуса *Didinium nasutum* использовали метод пульс-электрофореза. Молекулы ДНК макронуклеуса формируют непрерывный спектр в диапазоне от 50 до более чем 1000 т. п. н. Плотность ДНК вдоль дорожек возрастала от 50 т. п. н., достигала плато в диапазоне от 250 до 400 т. п. н. и затем быстро уменьшалась. Коротких молекул ДНК размером 0.4—25 т. п. н., соответствующих ДНК «генного» размера, не было обнаружено. Спектр распределения макронуклеарных ДНК *D. nasutum* гомогенный, без заметных полос, что указывает на отсутствие в макронуклеусе отдельных гиперамплифицированных молекул или наборов молекул со схожей длиной. Похожий спектр молекул ДНК, имеющий форму одиночного асимметричного пика без заметных полос, был описан, например, у *Paramecium caudatum*, в то время как у некоторых других видов, например видов комплекса *P. aurelia*, в спектрах макронуклеарной ДНК присутствуют интенсивные полосы, расположенные на фоне непрерывного спектра менее амплифицированных молекул.

Единственный заметный пик в кариотипе *D. nasutum* соответствует размеру хромосомных молекул *Saccharomyces cerevisiae* размером ~2000 т. п. н. и, по всей видимости, содержит ДНК микронуклеуса.

В интерфазном макронуклеусе *D. nasutum* молекулы ДНК упакованы в хроматиновые тельца, равномерно распределенные в пространстве макронуклеуса. Иногда хроматиновые тельца агрегируют, образуя короткие фибриллы из 2—4 телец. Размер хроматиновых телец варьировал от 80 до 265 нм (средний размер \pm SD = 183 \pm 38 нм, N = 426). При инкубации в растворах с низкой ионной силой хроматиновые тельца декомпактизуются с образованием ореола из нуклеосомных нитей вокруг них. Никаких коротких фибрилл хроматина, соответствующих ДНК «генного» размера, не обнаружено. Таким образом, данные как пульс-электрофореза, так и электронной микроскопии показывают, что *D. nasutum* относится к видам инфузорий с «субхромосомным» размером ДНК.

Математический анализ размеров хроматиновых телец и ДНК макронуклеуса *D. nasutum*, полученных с помощью пульс-электрофореза и электронной микроскопии, позволил сделать вывод о том, что практически все хроматиновые тельца содержат не одну, а две и более молекул ДНК. Молекулы ДНК в хроматиновых тельцах соединены теломерными концами с помощью ДНК-белковых взаимодействий. По структурной организации такие хроматиновые тельца аналогичны тельцам макронуклеусов *P. caudatum* и *Bursaria truncatella*.

РЕГУЛЯЦИЯ ВЫБОРА КЛЕТОЧНОЙ СУДЬБЫ В МЕЗЕНХИМИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ПУТЕМ ЭКСПРЕССИИ ЭКЗОГЕННОГО ПРОДУКТА ГЕНА РЕТИ-

НОБЛАСТОМЫ. © Б. В. Попов, П. С. Шило, Н. С. Петров. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, borisvp478@gmail.com

Жировые и мышечные клетки происходят из мезенхимных стволовых клеток (МСК), которые в ходе специализации проходят фазы детерминирования и терминалльной дифференцировки. Природа сигналов, вызывающих детерминирование при жировой (ЖД) и мышечной (МД) дифференцировках, недостаточно хорошо изучена в отличие от терминалльной дифференцировки, механизмы которой в значительной степени понятны. Инициация дифференцировки вызывается путем передачи сигналов нескольких сигнальных путей, среди которых потенциально важную роль играют Wnt/β-катенин и pRb (семейство продукта гена ретинобластомы).

Цель настоящей работы заключалась в оценке роли pRb влиять на выбор клеточной судьбы при инициировании дифференцировки МСК в жировую или мышечную линию. Для достижения этой цели мы использовали стабильные линии полипотентных мезенхимных клеток линии C3H10T1/2 (10T1/2), индуцируемых к дифференцировке в жировые и мышечные клетки в культуре. В дополнение к клеткам 10T1/2 дикого типа (WT), продуцирующим функционально активный эндогенный pRb, были использованы полученные нами ранее линии МСК 10T1/2, стабильно экспрессирующих экзогенный pRb дикого типа (ΔB/X), неактивный белок с мутацией в функциональном домене (ΔS/N) и конститутивно активный pRb с мутациями 8 сайтов фосфорилирования (Δp34). Клетки индуцировали к ЖД или МД путем культивирования в ростовой среде, содержащей соответственно индометацин, дексаметазон, 3-изобутил-1-метилксантин, инсулин или 5-азацитидин. ЖД оценивали через 0, 7 и 14 сут после начала индукции путем окрашивания клеток масляным красным и экстракции красителя для определения его количества на спектрофотометре, а МД — путем определения продукции десмина, маркера ранней мышечной дифференцировки, через 20 сут после обработки клеток 5-азацитидином.

Экспрессия функциональных форм экзогенного pRb — ΔB/X и Δp34 — усиливает, а ΔS/N тормозит ЖД по сравнению с клетками материнской линии. Индукция МД выявляет противоположную направленность: уровень десмина повышается только в клетках ΔS/N, тогда как экспрессия Δp34 тормозит формирование изоформы десмина с мол. массой 57 кДа, которая продуцируется в клетках 10T1/2 материнской линии.

Результаты ОТ-ПЦР выявляют в условиях ЖД синтез тканеспецифического индуктора PPAR γ , уровень экспрессии которого выше в клетках, продуцирующих ΔB/X и Δp34, чем в МСК материнской линии и ΔS/N. Индукция PPAR γ сочетается с синтезом терминалльных маркеров ЖД — адипонектина и Fabp4, но происходит без повышения экспрессии таких регуляторных факторов, как Bmi1, Mel18, Ezh2, p16, pRb и p130. Стоит отметить, что в не индуцированных к ЖД клетках, экспрессирующих функциональные формы экзогенного pRb, в иммуноблотинге выявляется повышенная продукция p130, общего и активного β-катенина, а после индукции ЖД уровень названных белков в значительной степени усиливается и дополняется увеличением количества p16. Полученные нами результаты дают возможность предположить важную роль белков семейства pRb, взаимодействующих с передатчиком сигналов Wnt —

β -катенином — в детерминировании ЖД и выборе клеточной судьбы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 12-04-00252 и 14-04-31115).

ИСКУССТВЕННОЕ ПРИВЛЕЧЕНИЕ ГЕТЕРОХРОМАТИНОВЫХ БЕЛКОВ SUUR И HP1 В РАЙОНЫ ОТКРЫТОГО ЭУХРОМАТИНА ПРИВОДИТ К ЗАМЕДЛЕНИЮ ДВИЖЕНИЯ РЕПЛИКАЦИОННОЙ ВИЛКИ. © Г. В. Пополкова, Д. Е. Коряков, А. В. Пиндюрин, О. В. Андреенков, С. Н. Белякин, Е. С. Беляева, И. Ф. Жимулев. Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, galina@mcb.nsc.ru

Разные последовательности ДНК в хромосомах эукариот реплицируются в разные периоды S-фазы клеточного цикла — раннем, среднем и позднем. Механизмы, регулирующие время репликации, остаются не до конца понятными. Дрозофиле благодаря наличию в некоторых тканях политетенных хромосом является удобной моделью для исследования процесса репликации. Гигантские размеры политетенных хромосом в клетках слюнных желез позволяют визуализировать тонкую картину репликации множества отдельных районов на цитологическом уровне.

Ранее в политетенных хромосомах были обнаружены районы с уменьшенным числом копий ДНК, в которых репликация не успевала завершиться до конца S-фазы. К таким районам относятся районы прицентромерного гетерохроматина и районы интеркалярного гетерохроматина в эухроматиновой части генома. Такие районы часто являлись местом посадки белков SUUR и HP1. Как HP1, так и SUUR являются белками, характерными для неактивного, «закрытого», хроматина. Белок HP1 является компонентом системы SU(VAR)3-9-зависимой инактивации. Мутация *SuUR* (*Suppressor of Underreplication*) приводит к более раннему завершению репликации и, как следствие, к восстановлению полного числа копий, по-видимому за счет ускорения движения репликационной вилки в отсутствие белка SUUR.

В настоящей работе мы исследовали влияние белков SUUR и HP1 на процесс репликации в районах «открытого» эухроматина 3B, 8D и 18B на X-хромосоме. В норме эти районы не содержат ни SUUR, ни HP1 и реплицируются в начале S-фазы. Для того чтобы искусственно привлечь в них изучаемые белки, была использована GAL4-UAS — система, где химерные конструкции *hsGAL4DBD-HP1* и *hsGAL4DBD-SUUR* содержали последовательность гена, присоединенную к ДНК-связывающему домену дрожжевого белка GAL4, под контролем промотора гена *hsp70*, а в районах 3B, 8D и 18B располагались сайты связывания для GAL4-UAS.

Основываясь на картине распределения белка PCNA — маркера репликации, мы показали, что привлечение как SUUR-DBDGAL4, так и HP1-DBDGAL4 приводит к замедлению процесса репликации в эухроматиновых районах: как и в норме, репликация начиналась в ранней S-фазе, однако завершалась заметно позже, чем в линиях без привлечения белков. Такого замедления оказалось недостаточно для возникновения недорепликации. SUUR-DBDGAL4 и HP1-DBDGAL4 по-разному влияли на репортерный ген *mini-white*, расположенный по соседству с сайтом таргетинга. Если привлечение SU-

UR-DBDGAL4 не влияло на его экспрессию, то HP1-DBDGAL4 полностью инактивировал *mini-white* даже на фоне мутации *Su(var)3-9*. Привлечение SUUR-DBDGAL4 и HP1-DBDGAL4 также по-разному влияло на белковый состав хроматина в районах таргетинга. HP1-DBDGAL4 вызывал исчезновение белка «открытого» хроматина CHRIZ, тогда как SUUR-DBDGAL4 не оказывал такого эффекта.

Таким образом, замедление репликации, вызванное SUUR и HP1, может определяться разными механизмами. Однако в обоих случаях конечным результатом этих эффектов может быть скорость движения репликационной вилки.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 13-04-40137-Н).

ЭКСТРАКЦИЯ ГИСТОНА H1 ПОЛИГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТОЙ ИЗ ЯДЕР С РАЗНЫМИ Mg-ЗАВИСИМЫМИ УРОВНЯМИ УПАКОВКИ ХРОМАТИНА И ВЛИЯНИЕ НА НЕЕ ДИСТАМИЦИНА. © А. Н. Прусов,¹ Т. А. Смирнова,^{1,2} Г. Я. Коломийцева.¹ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, prusov@genebee.msu.su, и² Научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва.

С помощью методов электронной микроскопии (ЭМ), КД-спектроскопии и экстракции гистона H1 поли(L)-глутаминовой кислотой (ПГ) изучена структура хроматина в выделенных ядрах печени крысы в среде низкой ионной силы с концентрацией ионов магния от 1 до 5 мМ. Снижение концентрации магния от 5 до 1 мМ, согласно данным ЭМ, вызывало структурный переход при 2 → 1 мМ от третьего ко второму уровню организации хроматина. Этот переход детектировался также методом КД при $\lambda = 320-340$ нм в комплексе ядерного хроматина с дистамацином А (ДМ). Экстракция гистона H1 под действием ПГ (ПГ/ДНК = 6) и результирующая ЭМ-картина остаточного хроматина существенно зависели от концентрации Mg. Обнаружено несколько фракций гистона H1, связанных с уровнями конденсации хроматина. При экстракции 1/8 тотального H1 в присутствии 5 мМ Mg хроматин остается конденсированным (глобулы 100—200 нм). В присутствии 3 мМ Mg из ядер экстрагируется 1/4 часть H1 и хроматин разворачивается до фибрилл 30 нм. При экстракции около 50 % H1 в присутствии ионов Mg ≤ 2 мМ хроматин разворачивается до 10 нм нуклеосомных фибрилл. Из оставшегося более прочно связанныго H1 до 25 % может быть экстрагировано в присутствии ДМ. При этом КД комплексов ДМ с хроматином зависел только от структуры хроматина, но не от концентрации Mg. В диапазоне 2—5 мМ Mg, когда сохраняется третий уровень упаковки хроматина, КД не изменялся и его рост наблюдался при переходе ко второму уровню при 1 мМ Mg. При действии ПГ деконденсация хроматина усиливалась с уменьшением концентрации Mg (начиная с концентрации Mg < 4 мМ) и сопровождалась линейным ростом КД. Увеличение концентрации ПГ до ПГ/ДНК = 30 существенно повышало экстракцию гистона H1 даже в присутствии 5 мМ Mg. Однако при насыщающей концентрации ДМ и высоком соотношении ПГ/ДНК = 30 около 5—10 % гистона H1 остаются прочно связанными в ядре.

ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ СЕМЕЙСТВА NF1 И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕНА ТРИПТОФАНДИОКСИГЕНАЗЫ (*tdo*) КРЫСЫ IN VIVO. © Е. В. Романовская, Е. А. Бобров, М. В. Вихнина, Г. И. Чихиржина. С.-Петербургский государственный университет, e.romanovskaya@spbu.ru

Выделяют особый класс транскрипционных факторов, участвующих в ремоделировании структуры хроматина регуляторной области генов до начала транскрипции. Предполагается, что эти факторы участвуют в формировании предустановленной (preset) структуры хроматина и реализации тканеспецифичной программы транскрипции. Известны немногочисленные данные, подтверждающие участие транскрипционных факторов семейства NF1 в поддержании протяженных областей хроматина в потенциально активном состоянии у эукариот. Для изучения роли транскрипционных факторов семейства NF1 в реализации программы тканеспецифичной экспрессии генов необходимы исследования корреляции между присутствием этих факторов в хроматине регуляторной области гена и его функциональным состоянием *in vivo*. В качестве модельного объекта нами выбран регулируемый глюкокортикоидными гормонами ген триптофандиоксигеназы (*tdo*) крысы, который экспрессируется преимущественно в печени, находится в репрессированном состоянии в почках и в состоянии компетенции к транскрипции в клетках гепатомы линии НTC. В регуляторной области этого гена в состоянии активной транскрипции обнаружены три конститутивных гиперчувствительных к ДНКазе I участка и сайты связывания рецептора глюкокортикоидных гормонов (Becker et al., 1984). Методом ретардации подвижности ДНК в геле (EMSA) в условиях конкуренции с разными последовательностями ДНК было установлено, что в области гиперчувствительных конститутивных участках взаимодействуют *in vitro* транскрипционные факторы семейства NF1. Анализ иммунохимическими методами частично очищенной фракции белков, используемых в опытах по ретардации, показал присутствие в ней транскрипционного фактора NF1-С. Эти данные указывают на возможное участие в формировании preset-структур хроматина регуляторной области гена *tdo* транскрипционных факторов семейства NF1. Для подтверждения этого предположения исследовали распределение NF1 в хроматине регуляторной области гена *tdo* *in vivo* методом иммунопрепарации фрагментов хроматина в сочетании с количественным вариантом ПЦР. При сравнительном анализе *in vivo* распределения NF1 в хроматине гена *tdo* в различном функциональном состоянии (печень, почки и клетки гепатомы) не выявлено существенного обогащения изучаемыми факторами конститутивных гиперчувствительных к ДНКазе I участков. Полученные результаты обсуждаются с позиции представлений о роли транскрипционных факторов семейства NF1 в обеспечении потенциально активного состояния протяженных областей хроматина.

ЗНАЧЕНИЕ ТРАНСКРИПЦИИ НЕКОДИРУЮЩИХ ЭЛЕМЕНТОВ ГЕНОМА В ХОДЕ ГАМЕТОГЕНЕЗА У ПОЗВОНОЧНЫХ. © А. Ф. Сайфитдинова. Биологический факультет С.-Петербургского государственного университета, a.saifitdinova@spbu.ru

Данные исследований по определению первичной последовательности ДНК у представителей различных видов показали, что количество генов, кодирующих белки, меняется незначительно не только у разных представителей типа позвоночных, но и в пределах многоклеточных организмов в целом, несмотря на существенные различия в уровне сложности их организации и развития. В то же время результаты сравнительного анализа геномов показали, что доля некодирующих последовательностей лавинообразно нарастает по мере усложнения живых организмов, и в частности у млекопитающих, достигает примерно 98 %. Анализ транскриптомов показал, что большая часть этих последовательностей транскрибируется, причем строго определенным образом и преимущественно в процессе индивидуального развития. Этот факт позволяет выдвигнуть предположение о том, что такие последовательности могут играть ключевую роль в становлении и поддержании организации все более сложных организмов. В последнее десятилетие механизм работы регуляторных сетей на основе некодирующих РНК стал понятнее благодаря открытию целого спектра РНК, отличающихся по функциям и размеру: от крошечных микроРНК до огромных, значительно превышающих матричные, длинные некодирующие РНК. Результаты проектов по расшифровке геномов модельных организмов показали, что некоторые некодирующие элементы, так же как и белок-кодирующие последовательности, высококонсервативны. В частности, к ним относятся отдельные участки, с которых транскрибируются длинные некодирующие РНК, а также короткие регуляторные и структурные элементы. Остальная же часть генома значительно более пластична. В то же время именно она, по-видимому, обеспечивает поддержание программ развития как целостных генных сетей на основе ограниченного набора белок-кодирующих последовательностей, а также лежит в основе эволюции сложных многоклеточных организмов.

У организмов с гипертранскрипционным типом оогенеза на стадии диплотены первого деления мейоза интенсивность транскрипции достигает своих максимальных значений. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что наиболее интенсивно транскрибируются участки, обогащенные повторяющимися последовательностями и некодирующими элементами генома, принадлежащими к менее консервативной части генома. Данные последних лет убедительно свидетельствуют о том, что при высоком уровне транскрипции увеличивается степень катранскрипционного мутагенеза исходной матричной ДНК. Результаты проведенного сравнительного анализа особенностей транскрипции ядерного генома в ходе проэмбрионального развития различных животных позволили сформулировать гипотезу о том, что транскрипция наряду с рекомбинацией участвует в поддержании стабильно-го уровня мутагенеза в линии клеток зародышевого пути. Таким образом обеспечивается необходимая для выживания популяции изменчивость и закладываются основы для эволюции. Имеющиеся данные свидетельствуют о существовании зависимости между организацией транскрипции ядерного генома в ходе проэмбрионального развития и стратегией заботы о потомстве, которая в свою очередь вносит вклад в определение стратегии полового размножения и оказывает влияние на характер хромосомного определения пола.

Работа выполняется в рамках проекта по финансовой поддержке ведущих научных школ НШ-3553.2014.4

и научного проекта С.-Петербургского государственного университета 1.37.153.2014.

СПИРАЛИЗОВАННЫЕ БЕЛКОВЫЕ СТРУКТУРЫ В КАРИОПЛАЗМЕ МАТЕРИНСКИХ КЛЕТОК ПЫЛЬЦЫ РЖИ *SECALE CEREALE* L. ПОСЛЕ ДЕГРАДАЦИИ СИНАПТОНЕМНЫХ КОМПЛЕКСОВ НА СТАДИИ ДИПЛОТЕНЫ МЕЙОЗА. © С. А. Симановский,¹ С. Н. Матвеевский,¹ И. В. Иорданская,² В. Е. Спангенберг,¹ О. Л. Коломиец,¹ Ю. Ф. Богданов.¹ ¹Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва, sergey.a.simanovsky@gmail.com, и ²Московский научно-исследовательский институт сельского хозяйства «Немчиновка» РАСХН, Московская обл.

Синаптонемный комплекс (СК), белковая структура, заполняющая пространство между двумя гомологичными хромосомами во время их мейотического синаптоза (конъюгации), формируется во время профазы I мейоза у абсолютного большинства эукариотических организмов. СК выравнивает гомологичные хромосомы и, подобно «застежке-молнии», удерживает их в точном регистре для «равного» (по генетической терминологии) кроссинговера. Полностью сформированные СК, соединяющие гомологичные хромосомы по всей длине, существуют только во время стадии пахитены, а начало деградации СК соответствует началу стадии диплотены.

В материнских клетках пыльцы ржи *Secale cereale* L. деградация СК происходит путем образования брешей в латеральных элементах СК и укорочения фрагментов СК до полного их исчезновения. При контрастировании СК раствором азотникислого серебра при pH 3.5–4.5 эти бреши оказываются заполненными нитями, которые связаны с латеральными элементами СК. По мере развития стадии диплотены и постепенного исчезновения фрагментов СК эти нити превращаются в субмикроскопические спирали. В данной работе мы установили, что нити и спирали, связанные с деградирующими синаптонемными комплексами, окрашиваются антителами к белку латеральных элементов ASY1 *Arabidopsis thaliana* и, таким образом, являются продуктами деградации сложно устроенных латеральных элементов СК.

У асинаптического мутанта *syu9* была выявлена спирализация осевых элементов (ОЭ) неспаренных хромосом. Процесс спирализации ОЭ в диплотене мутантов *syu9* был выражен сильнее, чем спирализации остатков ЛЭ в норме. Это является отличительной особенностью данной мутации. Не исключено, что у мутантов *syu9* нарушена укладка сжатой спирали в структуре латерального элемента СК на стадиях зиготены—пахитены. Параметры спирали белковых структур у мутанта соответствовали параметрам, обнаруженным на стадии диплотены у нормальных растений. Это дает нам основание говорить о том, что процессы демонтажа ОЭ/ЛЭ у асинаптических мутантов *syu9* и у нормальных растений протекают одинаково. В свою очередь это свидетельствует о не зависимом от центрального элемента СК механизме разборки ЛЭ.

ЗНАЧЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ЭУКАРИОТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ (ПРОТИСТОВ) ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ СОВРЕМЕННЫХ ПРЕДСТАВЛЕНИЙ О СТРУКТУРЕ И ФУНКЦИЯХ КЛЕТОЧ-

НОГО ЯДРА. © С. О. Скарлато. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, s_skarlato@yahoo.com

Полагают, что клеточное ядро,protoхромосомы и примитивный митоз структурно оформились у предка протистов около 2 млрд лет назад. Впервые ядро клетки было описано в конце первой трети XIX в Я. Пуркинье и Р. Брауном, а первые серьезные исследования ядерного аппарата протистов были выполнены приблизительно 50 лет спустя В. Кентом и О. Бюкли. К настоящему времени убедительно показано, что все протисты являются типичными эукариотами, поскольку их генетический аппарат отделен от цитоплазмы ядерной оболочкой, а для индивидуальных хромосом характерна сложная надмолекулярная организация. Гипотеза о мезокариотной природе динофлагеллят оказалась ошибочной. У всех протистов ядро подразделяется на следующие основные субкомпартменты и элементы: ядерная оболочка, поровые комплексы, периферическая ядерная ламина, другие части ядерного матрикса, ядрышки, различные ядерные тельца и включения в кариоплазму и, наконец, хромосомы, состоящие из хроматина. Многие из этих ядерных образований характеризуются у протистов удивительным структурным разнообразием. Интересно отметить, что в течение многих лет это наблюдение противоречило полученному в ходе ранних ультраструктурных исследований высших эукариот представлению о слабой компартментализации и структурированности интерфазного ядра по сравнению с цитоплазмой. Традиционно многие протисты являются удобными моделями для изучения структурной организации «минимально возможных» хромосом (мини-хромосом), политенных хромосом, теломерных сегментов, ядрышек, других ядерных структур и доменов, а также митоза, уровней компактизации хромосом, регуляции генной активности, мобильных элементов генома, диминуции хроматина и прочих ядерных процессов у эукариот.

В докладе на примере модельных объектов из числа жгутиконосцев, амеб, инфузорий, микроспоридий и некоторых других протистов будет показан уникальный вклад результатов исследований эукариотных микроорганизмов в становление современных представлений о структуре и функциях клеточного ядра. Для одноклеточных эукариотных микроорганизмов завершено или реализуется в настоящее время около 250 геномных проектов. Самые маленькие и самые большие ядерные геномы среди эукариот обнаружены у протистов. Самые маленькие геномы встречаются у протистов, которые являются obligатными внутриклеточными паразитами (например, микроспоридии) или древними эндосимбионтами (например, представляют собойrudиментарные эукариотные ядра хлоропластов — нуклеоморфы). Уменьшение размера генома у них происходит за счет сокращения числа генов, укорочения кодирующих и flankирующих регуляторных последовательностей, практически полного исчезновения инtronов и резкого уменьшения объема некодирующей ДНК, что приводит к повышению плотности расположения генов (компактизация генома). Внутриядерный митоз, короткие хромосомы и маленькие геномы, которые быстро реплицируются и экспрессируются, могут представлять адаптивные преимущества для быстрой пролиферации организма. Сделан вывод о том, что в отличие от высших эукариот у протистов обнаруживается настоящий «музей» различных типов структурной организации ядра, хромосом и митоза, которые могут существенно от-

личаться друг от друга по многим характеристикам. При этом ядерные аппараты многих свободноживущих и паразитических протистов в ходе жизненных циклов демонстрируют высокую генетическую пластичность.

АГРЕГАТЫ ПРОТЕАСОМ И ИНТЕРХРОМАТИНОВЫХ ГРАНУЛ В КЛЕТКАХ U-937 ПРИ АПОПТОЗЕ, ИНДУЦИРОВАННОМ ГИПЕРТОНИЧЕСКИМ ШОКОМ. © Е. С. Снигиревская, Я. Ю. Комиссарчик. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Работа посвящена изучению ультраструктурных перестроек клеток культуры U-937 при индукции в них апоптоза с помощью гипертонического шока.

В литературе разработаны морфологические критерии апоптоза — сморщивание клеток, конденсация хроматина, фрагментация хромосомной ДНК и экспозиция фосфатидилсерина на плазматической мембране (Bottone et al., 2013). Одними из первых изменений апоптозной клетки, визуализируемых в электронном микроскопе, являются конденсация хроматина и перераспределение в ядре хроматина и нехроматиновых компонентов ядра, в частности интерхроматиновых гранул и элементов ядрышка. В настоящей работе наряду с ядерными агрегатами крупных интерхроматиновых осмиофильных гранул (22—24) × (48—50) нм в ядре и цитоплазме апоптозных клеток обнаружены агрегаты мелких палочковидных частиц, отличающиеся от них своими размерами (10—12) × (30—40) нм. Проведенный ультраструктурный и иммуноцитохимический анализ позволил нам интерпретировать эти частицы как протеасомы (Snigirevskaia, Komissarchik, 2013). Размеры этих структур слегка превышают размеры выделенных из плазмы крови и негативно окрашенных протеасом (Zoeger et al., 2006), что, возможно, связано с сохранением их состояния при обработке материала, более близкого к нативному, чем при их выделении. Возможно, это обусловлено тем, что в клетке протеасомы связаны с убиквитином и гидролизуемыми в них белками, которые и определяют увеличение их размеров. К сожалению, протеасомы не имеют четко очерченных границ, как другие внутриклеточные органеллы, окруженные мембранными. Поэтому трудно говорить о деталях их структурной организации, выявляемой методами ультратонких срезов залитого в смолу материала. Полученные нами данные указывают на то, что наблюдаемые агрегаты протеасом выявляются не только в ядрах и цитоплазме клеток и апоптозных тел, но и во внеклеточном пространстве, куда они экструзируются на терминальных стадиях апоптоза.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-00101) и программы президиума РАН № 7.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НЕГИСТОНОВОГО БЕЛКА HMGB1 С ЛИНКЕРНЫМ ГИСТОНОМ H1. © А. А. Созонова,¹ Н. В. Михайлов,¹ Т. Ю. Старкова,^{1,2} Е. В. Чихиржина,² А. М. Поляничко,¹ a.polyanichko@spbu.ru ¹Физический факультет С.-Петербургского государственного университета и ²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Взаимодействие ДНК с линкерными белками хроматина играет ключевую роль при формировании наднукле-

осомной структуры хроматина. Среди линкерных белков хроматина наиболее многочисленны гистоны семейства H1 и негистоновые белки семейства HMGB. ДНК-связывающие свойства этих белков активно изучаются на протяжении последних десятилетий. На сегодняшний день известна пространственная структура как отдельных ДНК-связывающих доменов, так и их комплексов с синтетическими олигонуклеотидами. Однако структура надмолекулярных комплексов ДНК с этими белками до сих пор остается малоизученной. Практически отсутствуют экспериментальные данные о взаимодействии этих белков с ДНК на входе/выходе нуклеосомы. Последние обстоятельства обусловлены в первую очередь отсутствием экспериментальных подходов, с помощью которых можно было бы непосредственно анализировать структурную организацию столь крупных, многокомпонентных и отчасти гетерогенных комплексов. Ситуация осложняется тем, что сами белки способны к взаимодействию между собой, однако традиционные методики анализа структуры биомолекул, такие как круговой дихроизм, оказываются недостаточно чувствительными при исследовании комплексов HMGB1/H1. В данной работе нами проведено изучение взаимодействия белков HMGB1 и H1 методами ИК-спектроскопии, аналитического ультрацентрифугирования, динамического светорассеяния и электрорфореза в ПААГ.

Анализ полученных нами экспериментальных данных указывает на образование достаточно устойчивых белок-белковых комплексов в водно-солевых растворах. Основная доля комплексов (более 99 %) образуется в результате взаимодействия одной молекулы линкерного гистона H1 и одной молекулы негистонового хромосомного белка HMGB1. Незначительная доля белковых молекул образует более сложные комплексы, размеры которых многократно превышают размеры бинарных комплексов. Определение фрактальной размерности таких частиц показало, что в них может содержаться от 40 до 60 молекул белков. Нами было установлено, что образование бинарных комплексов HMGB1/H1 обусловлено электростатическими взаимодействиями отрицательно заряженных аминокислотных остатков белка HMGB1 с положительно заряженными областями гистона H1. Тем не менее при всех исследованных соотношениях H1/HMGB1 вблизи нейтральных pH не наблюдается перезарядки образующихся комплексов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-08-01134) и правительства Санкт-Петербурга. Часть исследований проведена с использованием оборудования ресурсных центров «Оптические и лазерные методы исследования вещества», «Диагностика функциональных материалов для медицины, фармакологии иnanoэлектроники» и «Развитие молекулярных и клеточных технологий» С.-Петербургского государственного университета.

СЛАБОЕ КОМБИНИРОВАННОЕ МАГНИТНОЕ ПОЛЕ, НАСТРОЕННОЕ НА ИОН-ПАРАМЕТРИЧЕСКИЙ РЕЗОНАНС ИОНОВ Ca^{2+} , УВЕЛИЧИВАЕТ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ДИКОГО ТИПА МЫШАМ MDX. © А. В. Соколова,¹ Г. В. Соколов,² В. М. Михайлов.^{1,1} Институт цитологии РАН, avsokolova@inbox.ru, и ²Центральный науч-

но-исследовательский институт им. акад. А.Н. Крылова, Санкт-Петербург.

В настоящее время широко исследуется возможность использования стволовых клеток костного мозга (ККМ) для лечения различных заболеваний, в частности такого заболевания, как мышечная дистрофия Дюшенна (МДД). Одной из лабораторных моделей МДД являются мыши *mdx*. Точечная мутация в гене дистрофина приводит к отсутствию этого белка у мышей *mdx*. Предыдущие исследования показали, что трансплантированные предварительно облученным мышам *mdx* ККМ участвуют в регенерации поперечнополосатых мышечных волокон (ППМВ). Однако, несмотря на то что наблюдается включение донорских ядер в состав ППМВ, значительно-го нарастания доли дистрофин-положительных волокон не наблюдается. Предполагают, что это связано с низкой транскрипционной активностью донорских ядер. Вероятно, требуется дополнительное воздействие на ППМВ для активации донорских ядер. В качестве такого воздействия нами было выбрано слабое комбинированное магнитное поле, настроенное на ион-параметрический резонанс ионов Ca^{2+} (Ca^{2+} -КМП). Показано, что слабые магнитные поля способны оказывать влияние на биологические объекты. В частности, описано влияние комбинированных магнитных полей на регенерацию тканей в различных системах. Целью работы было исследовать влияние Ca^{2+} -КМП на синтез дистрофина в ППМВ мышей *mdx* после облучения в дозах 5 и 3 Гр и последующей трансплантации ККМ. ККМ получали из бедренных и больших берцовых костей мышей C57BL/6 и трансплантировали мышам *mdx*, предварительно облученным лучами Рентгена в дозе 5 или 3 Гр. Ca^{2+} -КМП создавали с помощью установки, сконструированной Г. В. Соколовым (ЦНИИ им. акад. А. Н. Крылова). Радиационных химер *mdx*, облученных в дозе 5 или 3 Гр, подвергали воздействию Ca^{2+} -КМП каждый день (кроме выходных) по 30 мин в течение 4 нед. Данное воздействие начинали производить через 4 нед после трансплантации ККМ. Контрольные животные находились в магнитном поле Земли ($B_{dc} = 48 \text{ мкТл}$). У опытных и контрольных мышей исследовали четырехглавые мышцы бедра, в которых определяли долю дистрофин-положительных ППМВ, доли погибших ППМВ и ППМВ без центрально расположенных ядер (ЦЯ(-)). Показано, что у радиационных химер *mdx*, полученных путем внутривенного введения ККМ дикого типа облученным в дозе 5 или 3 Гр мышам *mdx* и подвергавшихся через 1 мес после трансплантации дополнительно в течение 1 мес воздействию Ca^{2+} -КМП, доля дистрофин-положительных ППМВ составила 15.8 ± 3.8 и $18.3 \pm 3.7\%$ соответственно, что значительно превышает значения, полученные для радиационных химер *mdx*, находившихся только в постоянном магнитном поле Земли (1.2 ± 0.6 и $5.7 \pm 1.6\%$). При этом доля ЦЯ(-) ППМВ в 2 раза превышала долю ЦЯ(-) ППМВ у химер *mdx*, находившихся в постоянном магнитном поле Земли. Таким образом, воздействие Ca^{2+} -КМП значительно повышает эффективность трансплантации ККМ мышам *mdx* после облучения в дозе 5 или 3 Гр. Ca^{2+} -КМП, вероятно, может или интенсифицировать функционирование донорских ядер, включившихся в состав ППМВ, или усиливать регенерацию, осуществляющуюся за счет ККМ, заменяя большее количество мутантных ядер ППМВ мышей *mdx* на ядра дикого типа из костного мозга.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-32205-мол_а).

МОДЕЛЬ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ «ГОРЯЧИХ» И «ХОЛОДНЫХ» ТОЧЕК РЕКОМБИНАЦИИ В МЕЙОТИЧЕСКИХ ХРОМОСОМАХ ЧЕЛОВЕКА. © В. Е. Спангенберг, С. Я. Дадашев. Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва, vspangenberg@gmail.com

Существует множество теоретических моделей организации хромосом в мейозе. Большая часть из них создана в эпоху развития молекулярной генетики и описывает взаимодействия структурных белков мейотической хромосомы и функциональных белков мейоза. Упаковка фибрилл хроматина в профазе I мейоза схематически изображается в виде петельно-осевой модели. Каркасная структура мейотического бивалента называется синаптонемным комплексом (СК). На протяжении лептотены-диплотены профазы I мейоза петли хроматина взаимодействуют с осевыми структурами мейотических хромосом. Однако вопрос о распределении «горячих» и «холодных» точек рекомбинации (ГТР и ХТР) в структуре петель хроматина до сих пор не решен. На основе исследований мейоза у дрожжей сложилось представление о том, что в основаниях петель хроматина (в так называемых межпетлевых доменах) формируются АТ-богатые треки ДНК. Рекомбинация происходит преимущественно на «вершинах» петель хроматина. Вместе с тем белки ранней рекомбинации RecA выявляются в связи с осевыми элементами хромосом. Авторы предполагают, что у дрожжей вершина петли мигрирует к СК (Blat et al., 2002). Для анализа линейного распределения событий мейотической рекомбинации в геноме человека нами использована база данных «International HapMap Project» (2006-10 rel 21phaseI+II http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/downloads/recombination/200610_rel21_phaseI+II/). Исследовано взаиморасположение ГТР и ХТР. Для изучения взаиморасположения ГТР и ХТР в геноме человека построена гистограмма интервалов между ними. Выявлено превышение частоты встречаемости интервалов ГТР—ХТР над случайным распределением для интервалов 20—50 т. п. н., а для интервалов более 90 т. п. н. — снижение частоты встречаемости ниже случайного распределения. Для анализа взаимного линейного расположения ГТР между соседними ХТР было исследовано распределение этих точек вдоль дистанции интервала. Нами обнаружено сложное распределение плотности ГТР в интервалах между соседними ХТР: наличие двух вершин для относительно небольших интервалов, их снижение — для больших интервалов между ХТР, а также тяготение ГТР к ХТР по мере увеличения интервала между ХТР. Таким образом, на основании наших данных и модели Блат и соавторов (Blat et al., 2002) предоставляется возможность интерпретации результатов исследования в терминах петельно-осевой модели строения хромосомы в мейозе. Нами предложена модель взаиморасположения ГТР и ХТР в петлях хроматина мейотической хромосомы человека. В основе модели лежат следующие положения: 1) ХТР — принятые за участки прикрепления петель хроматина к СК; 2) ГТР — предпочтительные сайты мейотической рекомбинации в петлях хроматина; 3) ГТР — могут располагаться случайным образом по геному, исключая межпетлевые домены хроматина; 4) существует зона

преимущественного формирования ГТР вблизи оснований петель хроматина. Таким образом, в модели распределения ГТР в петлях хроматина дрожжей предполагается максимум формирования ГТР в вершинах петель. В нашей модели, касающейся структурной организации петель хроматина человека, ГТР преимущественно расположены вблизи их оснований. Следует отметить, что у человека петли хроматина в среднем в 10 раз длиннее, чем у дрожжей (Kleckner, 2006). Мы предполагаем, что различия в распределении ГТР в петлях хроматина у человека и дрожжей связаны с 10-кратной разницей в длине петель хроматина и сохранением преимущественной зоны формирования ГТР независимо от длины петель.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-02071).

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ ЯДЕРНЫХ БЕЛКОВ ХРОМАТИНА Н1 И HMGB1/2 МЕТОДАМИ МАЛДИ- И ЭЛЕКТРОСПРЕЙ-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ. © Т. Ю. Старкова,¹ А. В. Бабич,² Е. И. Костылева,¹ Е. В. Скворцова,¹ А. М. Поляничко,^{1, 2} Е. В. Чихиржина,¹ А. Н. Томилин.¹
¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и ²С.-Петербургский государственный университет, физический факультет.

Плотность упаковки ДНК в хроматине и функционирование целого ряда «архитектурных» хромосомных белков опосредованы влиянием множественных посттрансляционных модификаций. Самыми изученными модификациями, оказывающими влияние на состояние хроматина, являются метилирование и ацетилирование по лизину (К) аминокислотных остатков гистонов Н3 и Н4. Однако на сегодняшний день все чаще в литературе появляются данные о наличии посттрансляционных модификаций линкерного гистона Н1 и взаимодействующего с ним негистонового хромосомного белка HMGB1. Основной проблемой исследований в данной области является сильное разногласие данных, полученных разными авторами, и сложность в понимании влияния найденных посттрансляционных модификаций на функционирование белков в клетке.

Основной задачей данной работы являлось охарактеризовать посттрансляционные модификации «линкерных» белков хроматина Н1 и HMGB1/2, выделенных из дифференцированных клеток, и проанализировать, насколько методы матрично активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) и электроспрей-масс-спектрометрии в методическом плане подходят для анализа посттрансляционных модификаций сложных белковых смесей.

Несмотря на сложности анализа белковых смесей, в частности речь идет о подтипах гистона Н1, методом «отпечатка пальцев» (peptide mass fingerprinting) посттрансляционные модификации белков Н1 и HMGB1/2 на N-концевом участке были охарактеризованы с большой точностью. В пробах белка Н1, выделенных из тимуса теленка и тимуса мыши, были выявлены подтипы Н1.1, Н1.2, Н1.3, Н1.4 и Н1.5. Среди найденных модификаций гистона Н1 доминируют модификации положительно заряженных остатков лизина в различных положениях. Установлено, что для гистона Н1 тимуса мыши характер-

ны ацетилирование в положении Lys 17 для подтипов Н1.2, Н1.3, Н1.4 и Н1.5, ацетилирование в положении Lys 26 для подтипа Н1.4 и метилирование в положениях Lys 34 и Lys 46 для подтипов Н1.1 Н1.2, Н1.3 и Н1.4. Показано, что для гистона Н1 тимуса теленка характерно ацетилирование в положении Lys 17 для подтипов Н1.2 и Н1.3. Описанные в работе модификации остатков лизина приводят к уменьшению положительного заряда полипептидной цепи вне глобулярного домена белка, что может выступать в качестве фактора, модулирующего характер связывания гистона Н1 с линкерными участками ДНК.

Найденные посттрансляционные модификации белков HMGB1/2 расположены в ДНК-связывающих доменах и носят высококонсервативный характер. Установлено, что линкерный участок белка HMGB2, связывающий два HMGB-домена белка, сильно ацетилирован. Для белка HMGB1 обнаружены сайты ацетилирования в положениях Lys 59-68 и Lys 140-160, сайт фосфорилирования белка HMGB1 в положении Тир 78. Показано, что у белка HMGB1 теленка/крысы присутствуют два сайта метилирования на С-концевом участке.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-08-01134) и правительства Санкт-Петербурга. Часть работ было выполнена с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центрnano- и биотехнологий ГОУ СПбГПУ» на базе ФГБОУ ВПО «СПбГПУ» при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ.

ЭВОЛЮЦИОННЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ РЕОРГАНИЗАЦИИ ГЕТЕРОХРОМАТИНА ПРИ ВИДООБРАЗОВАНИИ. © В. Н. Стегний. Томский государственный университет.

Важнейшим событием, связанным с видообразованием, является структурно-функциональная реорганизация гетерохроматина (Стегний, 1993). Близкородственные виды всегда различаются количеством и локализацией гетерохроматина. Существуют близкие виды, которые не имеют различий в структуре политенных хромосом (гомосеквентные), но при этом имеют четкие различия по гетерохроматину. Так, гомосеквентные виды гавайских дрозофил характеризуются структурными преобразованиями гетерохроматина по его размещению и количеству (Baimai, Ahearn, 1978; Yoon, Richardson, 1978). Подобная ситуация отмечена для гомосеквентных видов *Anopheles* (Coluzzi, 1970). Это свидетельствует о том, что гетерохроматиновые модификации являются основой перестройки генома при видообразовании. Очевидно, что наряду с реорганизацией архитектуры хромосом в ядрах генеративной ткани (Стегний, 1979) реорганизация гетерохроматина — основа сальтационного видообразования. Проведенный нами анализ ряда близкородственных видовых комплексов *Drosophila* и *Anopheles* позволил выявить закономерности реорганизации гетерохроматина при видообразовании. Эволюционно исходные («родительские») виды являются стволовыми и обычно имеют гетерохроматин в локализованном состоянии в хромоцентрах, микрохромосомах, половых хромосомах и центромерных районах. У эволюционно производных («дочерних») видов гетерохроматин «диспергируется» по

хромосомам, причем у видов, терминирующих филетические линии, «диспергирование» достигает максимальных значений.

Так, в подгруппе *Drosophila melanogaster* эволюционно исходный вид *D. orena* в трофоцитах яичников имеет локализованный в хромоцентре гетерохроматин, а у дочерних видов он расположен в разных хромосомных областях. Аналогичная ситуация характерна для группы *virilis*, где у стволового вида *D. virilis* гетерохроматин сконцентрирован в центромерном районе, тогда как у производных видов он «диспергируется» по хромосомам. При этом у видов, обладающих хромосомным (инверсионным) полиморфизмом и обычно терминирующих филетические линии, «диспергирование» достигает максимальных значений (Стегний, 2013). Молекулярный состав гетерохроматина представлен разными фракциями, среди которых доминируют сателлитная ДНК и МГЭ (Стегний и др., 2012), которые при «диспергировании» гетерохроматина генерируют разрывы хромосом, приводящие к формированию фиксированных (межвидовых) и флуктуирующих (внутривидовых) инверсий. Убедительные данные о роли гетерохроматина в формировании репродуктивных барьеров при видеообразовании получены при анализе близких видов *D. melanogaster* и *D. simulans* (Ferree, Barbash, 2009). Стерильность гибридных самок была связана с нарушением митоза в раннем эмбриогенезе, индуцированным нехваткой участка 359- bp сателлитного блока. Таким образом, репродуктивную изоляцию дочернего и родительского видов может обеспечить измененная нуклеотидная последовательность в гетерохроматине, что возникает сальтационно безо всяких географических или экологических изоляционных механизмов. Это еще раз подтверждает, что видеообразование не является градуальным процессом, а имеет облигатно-сальтационный характер.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЯДРЫШЕК В ПРОФАЗЕ ООГЕНЕЗА СВИНЫЙ ДОМАШНЕЙ. © В. Н. Стефанова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

В работе была проанализирована структурно-функциональная характеристика ядрышковых структур, выявляемая с помощью окрашивания азотникислым серебром, в оогенезе и в соматических клетках яичника свиньи домашней. В клетках фолликулярного эпителия наблюдали от 1 до 4 разнообразных по форме и размеру ядрышек, среднее число ядрышек составляло 1.74 ± 0.04 . В крупных ядрах оогоньев ядрышки имели гетерогенную структуру: четко прослеживались окрашенная серебром зона и слабо прокрашенная (желто-коричневая).

На стадии лептотены в ядре обнаруживали от 1 до 4 ядрышек. При этом окрашенные серебром зоны в виде круглых дискретных структур занимали периферическое положение, а среднее число ядрышек составляло 2.26 ± 0.09 , модальное число ядрышек было равно 2. Клетки на стадии зиготены встречались редко (вследствие непродолжительности этой стадии в профазе оогенеза свиньи), а сами ядрышки были расположены внутри клубка хромосом, что затрудняло их подсчет и анализ. Немногие доступные для анализа клетки на стадии зиготены имели по 1—2 ядрышкам в ядре.

С наибольшей частотой на препаратах наблюдали клетки на стадии пахитены с 1—2 крупными ядрышками,

среднее число ядрышек составляло 1.46 ± 0.04 . На этой стадии можно было зафиксировать принадлежность ядрышка к определенному биваленту; при этом проксиимальная часть ядрышка была окрашена серебром, а дистальная имела желто-коричневую окраску. В ядрах с 2 ядрышками 1 из них было меньше другого, но не превышало размера ядрышка в одноядрышковых ядрах. На стадии поздней пахитены выявляли связь более крупного ядрышка с более коротким бивалентом (хромосома 10), а длинный бивалент (хромосома 8) формировал ядрышко меньшего размера. На пахитене довольно часто отмечали структуры типа микроядрышек, которые хаотично распределялись по ядру. На стадии диплотены наблюдали 1 крупное ядрышко округлой формы. При этом окрашенные серебром зоны также занимали периферическое положение, но нередко они имели форму сдвоенных структур.

Таким образом, на протяжении профазы мейоза в оогенезе наблюдали уменьшение числа ядрышек и увеличение их размеров, что отражает высокую транскрипционную активность ядрышковых организаторов в ооцитах, синтезирующих рРНК, используемую как самим ооцитом в процессе его созревания, так и на первых стадиях развития эмбриона.

По данным литературы, до образования фолликула в ядрышках ооцитов свиньи происходит активный синтез рРНК и само ядрышко имеет нуклеолонемное строение, а с образованием антравального фолликула транскрипционная активность ядрышка резко падает (Crozet et al., 1981).

Обнаруженные нами структуры типа микроядрышек могут указывать на то, что в ооцитах свиньи, как и у человека (Wolgemuth-Jarashow et al., 1977), наблюдается незначительная амплификация рРНК.

Представленные данные будут сопоставлены с аналогичными данными, полученными в оогенезе у коров.

ОСОБЕННОСТИ КОМПАКТИЗАЦИИ ЭУ- И ГЕТЕРОХРОМАТИНА ЭУКАРИОТ В МИТОЗЕ. © О. С. Стрелкова,^{1,2} О. А. Жиронкина,^{2,3} В. Д. Черепанинцев,^{2,3} С. Ю. Курчашова,² И. И. Киреев.^{2,3} ¹Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, temchromatinlab@gmail.com, ²Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова и ³Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

Хроматин, представленный в клетках эукариот в виде сложного нуклеопротеинового комплекса, обеспечивает хранение, реализацию и передачу генетической информации. На сегодняшний день структурная организация и функциональные особенности репликации и транскрипции ДНК достаточно хорошо изучены на молекуларно-биологическом уровне. Однако плотная упаковка ДНК в комплексе с белками ведет к возникновению топологических проблем. Известно, что существует иерархический порядок в укладке хроматина: двухспиральная ДНК в комплексе с гистонами образует 10-нанометровую нуклеосому, которая в свою очередь упаковывается в 30-нанометровую фибрillу. Высшие уровни компактизации представлены хромонемами, структурами толщиной 150—250 нм, а наиболее плотная упаковка про-

исходит в митотических хромосомах. Вопрос о высших уровнях компактизации хроматина до сих пор остается дискуссионным и дополнительно осложняется в связи с функциональной и структурной неоднородностью хроматина, который разделяют на ранореплицируемый эухроматин и позднереплицируемый гетерохроматин.

Остается неизвестным, как происходит компактизация уже отреплицируемого эу- и гетерохроматина непосредственно перед митозом, одинакова ли она для двух различных фракций или идет по разным механизмам. Для понимания этого вопроса мы использовали метод недеструктивного репликативного мечения и отложенной метки, максимально сохранив нативную организацию хроматина в митозе. Ультраструктурную организацию постреплицируемого эу- и гетерохроматина визуализировали на электронно-микроскопическом уровне с помощью антител, коньюгированных с золотом, и дополнительного усиления серебром. В связи с тем что в митозе хроматин плотно упакован, возникают проблемы визуализации его тонкой ультраструктуры. Поэтому для воссоздания организации генома в объеме мы использовали метод серийных срезов, а также электронную томографию. Анализируя полученные данные, мы обратили внимание на некоторую разнородность в укладке эу- и гетерохроматина в профазе митоза. Наблюдается топологическое различие в распределении двух фракций по всему объему ядра: для эухроматина характерно диффузное распределение, тогда как гетерохроматин собирается в более плотные структуры. Помимо этого, различия наблюдаются в распределении метки внутри одного репликативного домена. Гетерохроматин демонстрирует высокую плотность метки в отличие от довольно разреженной эухроматиновой метки. Такая разнородность предположительно связана с архитектурными белками хромосом, селективно ассоциированными с эу- и гетерохроматином, например конденсинами I и II.

Полученные данные наглядно иллюстрируют различия в характере компактизации двух различных фракций генома и позволяют утверждать, что в компактизации эу- и гетерохроматина задействованы различные механизмы упаковки.

ДИНАМИКА ДЕМЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК МЕТАФАЗНЫХ ХРОМОСОМ ДОИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЗАРОДЫШЕЙ ЧЕЛОВЕКА. © А. В. Тихонов,^{1,2} О. А. Ефимова,^{1,2} А. А. Пендина,^{1,2} М. И. Крапивин,¹ Т. В. Кузнецова,^{1,2} В. С. Баранов.^{1,2} ¹С.-Петербургский государственный университет, tixonov5790@gmail.com, и ²Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта, Санкт-Петербург.

Эпигенетическое репрограммирование генома является важнейшим событием доимплантационного развития млекопитающих. Ключевым этапом эпигенетического репрограммирования является стирание родительских паттернов метилирования ДНК за счет деметилирования, необходимое для последующего установления нового, специфичного для генома клеток развивающегося зародыша характера метилирования. В 2011 г. на модельных объектах было показано, что одним из этапов деметилирования генома доимплантационного зародыша является образование 5-гидроксиметилцитозина в качестве промежуточного продукта. Специфична ли эта модификация

цитозина для доимплантационного развития человека, неизвестно. Целью настоящего исследования явилось изучение распределения и динамики эпигенетических модификаций цитозина — 5-гидроксиметилцитозина (5hmC) и 5-метилцитозина (5mC) — на метафазных хромосомах зигот и бластомеров дробящихся зародышей человека. Выявление модификаций цитозина проводили иммуноцитохимическим методом с помощью специфических антител к 5hmC и 5mC на фиксированных препаратах метафазных хромосом.

При анализе интенсивности флуоресценции на стадии зиготы выявлены различия между родительскими наборами метафазных хромосом: отцовские хромосомы характеризовались более высоким содержанием 5hmC и низким 5mC по сравнению с хромосомами материнского происхождения. Участки ДНК, обогащенные 5hmC, преимущественно локализовались в R-сегментах метафазных хромосом, тогда как в G-сегментах и в блоках промежуточного гетерохроматина хромосом 1, 9, 16 и Y они отсутствовали. Сегментной специфичности в распределении 5mC на метафазных хромосомах зигот выявлено не было. На стадии 2—3 бластомеров выявлены хромосомы с асимметричным расположением 5hmC и 5mC в сестринских хроматидах: интенсивность и характер метилирования и гидроксиметилирования в одной хроматиде соответствовали выявленным на стадии зиготы, в то время как вторая хроматида практически не содержала 5hmC и 5mC. Асимметричные хромосомы были выявлены на всех последующих стадиях деления дробления вплоть до бластоциты. Их число уменьшалось в ходе делений дробления, тогда как число хромосом с отсутствием 5hmC и 5mC в обеих хроматидах увеличивалось. Наблюдаемая картина, вероятнее всего, обусловлена зависимой от репликации (или пассивной) потерей 5hmC и 5mC.

Таким образом, в настоящем исследовании впервые показано, что в глобальном деметилировании ДНК у зародышей человека участвует несколько механизмов: активное деметилирование с образованием 5hmC, происходящее преимущественно в мужском геноме на стадии зиготы и характеризующееся селективностью в отношении сегментов хромосом, пассивная потеря 5hmC и пассивная потеря 5mC при последующих делениях дробления. Гидроксилирование 5mC является стабильной модификацией генома дробящегося зародыша человека, так как 5hmC, образовавшийся на стадии зиготы, сохраняется в течение всего доимплантационного развития вплоть до стадии бластоциты. Существенные изменения паттернов метилирования и гидроксиметилирования ДНК необходимы для репрограммирования генома зародыша и подготовки к началу тканевой дифференцировки.

Работа выполнена при финансовой поддержке правительства Санкт-Петербурга, Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-01978-а), стипендии президента РФ СП-1305.2012.4 и частичной финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-15-00737).

КОНСЕРВАТИВНЫЙ СУБТЕЛОМЕРНЫЙ ТАНДЕМНЫЙ ПОВТОР РО41 ТРАНСКРИБИРУЕТСЯ В СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ОТРЯДА GALLIFORMES. © И. Л. Трофимова, Д. А. Попова, А. В. Маслова, А. В. Красикова. С.-Петербургский государственный университет, alla.krasikova@gmail.com

До недавнего времени отличительной характеристики тандемных повторов ДНК гетерохроматина, образующего (пери)центромерные, субтеломерные и теломерные районы хромосом, считалась их транскрипционная инертность, а единичные данные об их транскрипции оставались без внимания. В настоящее время феномен транскрипции тандемно повторяющейся ДНК показан для многих организмов и клеток в культуре. Цель данного исследования — сравнительное изучение транскрипционной активности тандемного повтора РО41 у представителей отряда Galliformes: домашней курицы *Gallus gallus domesticus* и японского перепела *Coturnix coturnix japonica*. Субтеломерный тандемный повтор РО41 (от англ. pattern of 41 bp) консервативен как по нуклеотидной последовательности, так и по хромосомной локализации среди представителей отряда Galliformes, что может указывать на универсальные функции транскриптов повтора.

G- и C-богатые транскрипты повтора РО41 были детектированы с помощью ДНК/РНК-FISH в ядрах клеток мозжечка, большого мозга, мышц, яйцевода, тонкого и толстого кишечника в тканях как курицы, так и перепела. Картина распределения транскриптов повтора РО41 и морфология фокусов транскрипции имеют универсальный характер как в здоровых дифференцированных соматических тканях, так и в малигнлизированных клетках лимфобластомы курицы. В интерфазном ядре транскрипты повтора РО41 образуют 1—2 фокуса, соответствующих «фабрикам транскрипции», и(или) диспергированное облако, содержащее некодирующую РНК (нкРНК) РО41. Результаты ДНК/РНК-FISH после предобработки препаратов с помощью различных РНКаз (РНКазы A, РНКазы H и РНКазы III) свидетельствуют о том, что образующаяся длинная нкРНК РО41 преимущественно однократочечная, но формирует в отдельных участках шипачиную или суперскрученную структуру.

Используя иммуно-FISH, мы показали, что транскрипция массива повторов РО41 происходит с помощью РНК-полимеразы II, а образующиеся фокусы транскрипции не колокализованы с известными ядерными тельцами, такими как тельца Кахала, ядерные стресс-тельца и ядерные «спектлы».

Анализ распределения нкРНК РО41 в ходе клеточного цикла показал, что в профазе транскрипты образуют яркие фокусы в ядрах, тогда как в метафазе они локализуются между конденсированными хромосомами. 3D-реконструкция митотических клеток показала, что в ранней анафазе транскрипты РО41 ориентированы в экваториальной плоскости делящейся клетки, затем равномерно расходятся по дочерним клеткам. В поздней телофазе транскрипты ассоциированы с хромосомами, что может быть обусловлено их регуляторным значением, в частности участием транскриптов в формировании терминального гетерохроматина.

Таким образом, в работе показана транскрипция субтеломерного тандемного повтора ДНК в соматических и малигнлизированных клетках представителей отряда Galliformes. При этом наблюдаются универсальная картина распределения транскриптов и морфология фокусов транскрипции в разных тканях *G. g. domesticus* и *C. c. japonica*. Показано, что транскрипты РО41 не колокализуются с рядом ядерных телец. Получены приоритетные данные о распределении некодирующей РНК субтеломерного повтора РО41 на разных стадиях клеточного цикла.

Исследование проведено с использованием оборудования РЦ «Хромас» и РЦ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» С.-Петербургского государственного университета.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ Z-ХРОМОСОМЫ В ПРИСУТСТВИИ W-ХРОМОСОМЫ У ПТИЦ. © А. В. Трухина, А. Ф. Смирнов. Кафедра генетики и биотехнологии С.-Петербургского государственного университета, trukhina_ant@mail.ru, smiraf@gmail.com

Половые хромосомы играют ключевую роль в детерминации и дифференцировке пола у позвоночных животных. Для большинства изученных видов показано, что половые хромосомы являются гетероморфными: одна из них — крупная и богатая генами (Х или Z), а другая содержит небольшое количество генов, протяженные гетерохроматиновые участки и имеет маленький размер (Y или W). Они не способны к синапсису и рекомбинации в мейозе, за исключением небольших районов, называемых псевдоаутосомными. Z/X- и W/Y-хромосомы содержат разное число копий генов, для которых дозовые различия обычно летальны. У млекопитающих, *Drosophila* и *Caeenorhabditis elegans* для сбалансирования различий в числе генов, расположенных в X-хромосомах самок и самцов, используется дозовая компенсация. У птиц, однако, большинство генов в Z-хромосомах избегает эффекта компенсации, и только небольшое число генов агрегирует с гиперметилированной (МНМ) областью на дистальном конце короткого плеча Z-хромосомы.

МНМ-район связан с полоспецифичным ДНК-метилированием, гистон-ацетилированием, с некодирующими РНК, которые экспрессируются исключительно на Z-хромосоме самок курицы. Функция МНМ-некодирующей РНК пока еще неясна. Гипометилирование ДНК и гиперациетилирование гистона H4K16 делают сМНМ-район высокотранскрипционно активным районом. Конечным продуктом экспрессии этого района является некодирующая РНК, которая преимущественно остается в ядре и влияет на гены, примыкающие к сМНМ-участку на Z-хромосоме.

Предполагают, что некоторые до сих пор еще неизвестные гены, расположенные в W-хромосоме, проявляют положительную самка-определяющую функцию (как и в случае с Y-хромосомой у самца). Необходимо также учитывать, что около 65 % ДНК-последовательности W-хромосомы представлено двумя семействами повторов (*XbaI* и *EcoRI*) и большая ее часть является гетерохроматиновой.

Хромосома W птиц по многим признакам напоминает Y-хромосому организмов, имеющих XX/XY-систему определения пола. Для них достаточно присутствия в геноме Y-хромосомы, чтобы активизировались самец-определяющие гены в X-хромосоме, и связано это с эффектом положения мозаичного типа. Под влиянием присутствия в геноме дополнительного количества конститутивного гетерохроматина Y-хромосомы инактивированные на X-хромосоме гены супрессируются соответствующими генами-модификаторами эффекта положения и становятся активными. Это приводит к выработке самец-специфических продуктов. Механизм влияния конститутивного гетерохроматина на активацию полоопределяющих генов пока еще неясен. Возможно, то же самое происхо-

дит и у птиц. Под влиянием гетерохроматина W-хромосомы курицы активируются гены, продукты которых отвечают за деметилирование участка сМНМ, и снимается блок с близлежащих генов, таких как *DMRT1* и др. В результате активируется экспрессия полоопределяющих генов с Z-хромосомы курицы и детерминируется пол самки. У самцов (ZZ) же этого не происходит, и гены, расположенные вблизи гиперметилированного участка сМНМ, остаются молчаними. В нашей работе с опытами по деметилированию ДНК с помощью 5-азасидтидина, проведенной на курице, показано, что у экспериментальных самцов происходит сдвиг формирования гонад по типу самок.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-00994-а).

МЕЖВИДОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ В РАСПРЕДЕЛЕНИИ ДНК ПРИЦЕНТРОМЕРНОГО ГЕТЕРОХРОМАТИНА АНЦЕСТРАЛЬНОГО ВИДА *DROSOPHILA VIRILIS* НА ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМАХ ВИДОВ ГРУППЫ *VIRILIS*. © К. Е. Усов, И. Э. Вассерлауф, В. Н. Стегний. Национальный исследовательский Томский государственный университет, usovke@rambler.ru

Известно, что группа *virilis* включает в себя 12 видов дрозофил, которые подразделяются на две филады — *virilis* и *montana*, а *Drosophila virilis* является анцестральным видом для всей группы. Целью настоящей работы явилось исследование реорганизации последовательностей ДНК прицентромерного гетерохроматина *D. virilis* на политенных хромосомах трофоцитов и клеток слюнных желез близкородственных видов группы *virilis* рода *Drosophila*. Для этого была проведена микродиссекция хромоцентра политенных хромосом *D. virilis*. На основе микродиссекционной ДНК-библиотеки («DvirIII») был получен флуоресцентно меченный ДНК-зонд и проведена его гибридизация *in situ* (FISH) с политенными хромосомами клеток слюнных желез и трофоцитов видов группы *virilis*. Изучение распределения ДНК хромоцентра *D. virilis* на политенных хромосомах слюнных желез у видов группы *virilis* позволило выявить общие черты в ее локализации. Так, у всех видов пометились хромоцентр и довольно протяженный район хромосомы 5. Однако у видов филады *montana* в отличие от видов филады *virilis* обнаружаются яркие сигналы в хромосоме 2. Кроме того, у большинства видов группы *virilis* данная проба была обнаружена в некоторых интеркалярных районах политенных хромосом и различалась по локализации в этих районах у разных видов. В целом у видов группы *virilis* были выявлены резкие видоспецифичные различия по локализации пробы «DvirIII» в хромосомах 2 и 5. Анализ распределения ДНК из хромоцентра *D. virilis* на политенных хромосомах трофоцитов у видов группы *virilis* показал, что у всех видов эти последовательности локализуются в прицентромерных районах всех хромосом, в теломерном районе хромосомы 5. В отличие от видов филады *virilis* у видов филады *montana* в метacentрической хромосоме 2 помимо прицентромерного района метился дополнительный район данной хромосомы. В отличие от политенных хромосом слюнных желез в хромосомах трофоцитов сигналов в интеркалярных районах не было обнаружено.

Таким образом, сравнительный анализ локализации ДНК хромоцентра *D. virilis* на политенных хромосомах

трофоцитов и клеток слюнных желез видов группы *virilis* позволил выявить видовую специфичность в ее локализации, что особенно ярко проявилось у видов, относящихся к разным филадам (*virilis* и *montana*). Также показано, что межвидовые различия в архитектуре ядер трофоцитов у видов разных филад группы *virilis* отражаются на характере распределения ДНК хромоцентра *D. virilis*. Обнаружены как общие, так и тканеспецифичные районы локализации последовательностей ДНК хромоцентра *D. virilis* на хромосомах трофоцитов и клеток слюнных желез видов группы *virilis*. Известно, что основу эволюционных преобразований кариотипов в группе *virilis* составляют транслокации и инверсии хромосомных участков, которые привели к изменению структуры и морфологии хромосом. Полученные нами результаты позволяют считать, что хромосомные перестройки играют важную роль в перераспределении последовательностей ДНК гетерохроматина в геноме, которые являются одним из механизмов видеообразования, что в целом может повлиять и на изменение ориентации хромосом в трехмерном пространстве ядра.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта Министерства образования и науки РФ, а также при частичной финансовой поддержке гранта президента РФ (НШ-1279.2014.4).

ИДЕНТИФИКАЦИЯ УЧАСТКА СВЯЗЫВАНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА P53 С ПРОМОТЕРНОЙ ОБЛАСТЬЮ NR4A3. © О. А. Федорова,^{1,2} А. А. Дакс,² П. Н. Курылко,² Н. А. Барлев.^{1,2} ¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, fedorovaolgand@gmail.com, ²С.-Петербургский государственный технологический институт (Технический университет).

Ядерные рецепторы играют важнейшую роль в патогенезе раковых заболеваний. Современные методы лечения рака используют ряд соединений, которые модулируют функции ядерных рецепторов и подавляют развитие злокачественных новообразований. Ядерные рецепторы группы 4 подгруппы А (NR4A) относятся к «сиротским» рецепторам, для которых эндогенный лиганд на данный момент неизвестен. Эти рецепторы представляют собой транскриptionные факторы, модулирующие экспрессию множества генов и участвующие в таких важнейших клеточных процессах, как апоптоз (Fas-Ligand, TRAIL), пролиферация, репарация ДНК, метаболизм, миграция клеток, воспаление (интерлейкин 8) и ангиогенез (VEGF). На данный момент все большее количество исследователей предполагают, что ядерные рецепторы NR4A играют роль молекулярных модуляторов выживаемости клеток. Различные клеточные сигнальные пути, включая протеинкиназы А, NF κ B, PI3K, MAP-киназы и т. д., могут регулировать функции NR4A. Известно, что при различных раковых заболеваниях, таких как рак молочной железы, легких, толстой кишки и мочевого пузыря, уровень экспрессии белков NR4A изменен. Обнаружение новых факторов, которые модулируют уровень экспрессии ядерных рецепторов NR4A, представляет собой важную фундаментальную задачу и имеет прикладное значение для современной медицины.

Целью представленной работы является определение влияния транскриptionного фактора p53 на уровень экспрессии NR4A3, представителя семейства NR4A, а также локализация сайта связывания промоторной области гена NR4A3 с транскриptionным фактором p53.

В данной работе были использованы клеточные линии U2-OS p53⁺, U2-OSp53KD (нокдаун гена p53), НСТ-116 p53⁺ и НСТ-116 p53⁻ (нокаут гена p53). Для стабилизации белка p53 клетки обрабатывали противоопухолевым препаратом доксорубицином в течение 9, 12 и 24 ч в концентрации 0.5 мкМ. Уровень экспрессии белков p53 и NR4A3 оценивали с помощью Вестерн-блот-анализа. Нами было показано, что уровень экспрессии белка NR4A3 при активации транскрипционного фактора p53 достоверно отличается от уровня экспрессии в клеточных линиях, где p53 не активирован или отсутствует. Для установления участка связывания транскрипционного фактора p53 с промоторной областью гена NR4A3 была использована методика хроматиновой иммунопреципитации. Для этого геномную ДНК из клеток U2OS p53⁺ или U2OS p53KD через 16 ч после обработки доксорубицином фиксировали с ассоциированными с ней белками с помощью формальдегида и подвергли ультразвуковой обработке. В результате были получены фрагменты ДНК с белками. Затем, используя антитела, специфические к p53, провели иммунопреципитацию комплексов, состоящих из p53 и связанных с ним фрагментов ДНК. Была картирована промоторная область NR4A3, а затем с помощью ПЦР идентифицирован сайт связывания с p53.

Наши данные свидетельствуют о регуляции экспрессии NR4A3 транскрипционным фактором p53 на уровне белка, а также за счет взаимодействия p53 с участком промоторной области NR4A3.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта правительства РФ (№ 11.G34.31.0069 от 21.10.2011) и Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 14-04-32242-мол_а, 13-04-01024-а и 12-04-01397-а).

СКАНИРУЮЩАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ ВНУТРИЯДЕРНЫХ ТЕЛЕЦ ООЦИТОВ ГОЛУБЯ СИЗОГО И АФРИКАНСКОЙ ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ.
© Т. А. Ходюченко, А. В. Красикова, Т. В. Куликова.
С.-Петербургский государственный университет, alla.krasikova@gmail.com

Ядра ооцитов амфибий и птиц благодаря своим гигантским размерам представляют собой удобные объекты для проведения исследования особенностей внутриядерной компартментализации. Основным механизмом внутриядерной компартментализации является формирование высокоспециализированных доменов различных морфологии и молекулярного состава. Среди ядерных структур растущих ооцитов африканской шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* можно различить хромосомы типа ламповых щеток, амплифицированные ядрышки, экстрахромосомные накапливающие белок коилин тельца («жемчужины») и тельца гистонового локуса, ТГЛ) и Б-снурпосомы (клusters интерхроматиновых гранул, КИГ). В ядрах поздних ооцитов голубя сизого *Columba livia* присутствуют хромосомы типа ламповых щеток и ассоциированные с ними белковые тела, а также обогащенные белком коилином внутриядерные сферы. Молекулярный состав внутриядерных телц ооцитов амфибий и птиц охарактеризован с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания, однако немного известно об особенностях ультратонкой структуры их поверхности и характере распределения в них основных компонентов.

В представленной работе с помощью низковольтной сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) мы проанализировали ультратонкую структуру поверхности внутриядерных телец ооцитов голубя сизого и африканской шпорцевой лягушки. СЭМ позволяет идентифицировать на препаратах содержимое ядер ооцитов амфибий многочисленные ядрышки, ТГЛ и КИГ. При детальном рассмотрении поверхность ядрышек выглядит «вязаной», с многочисленными гранулами размером около 40—60 нм и более крупными выступающими образованиями размером от 200 до 350 нм. Неровная бугорчатая поверхность ТГЛ испещрена многочисленными порами (диаметр около 20—25 нм) и покрыта «пochками» размером около 100—200 нм. К тельцам с помощью фибриллярных тяжей толщиной около 12—25 нм прикреплены хорошо заметные КИГ. По сравнению с ТГЛ амфибий содержащие коилин полые сферы ооцитов голубя существенно более гладкие. На их плотной, без выраженных гранул поверхности различимы только редко встречающиеся мелкие поры и слаженные бугорки (размером около 30—50 нм). Ассоциированные с хромосомами центромерные белковые тела имеют неоднородный рельеф поверхности с многочисленными извилинами, выростами и порами разного размера. Такой уровень ультраструктуры рельефа ядерных телец ооцитов птиц и амфибий ранее не был описан.

Анализ распределения основных компонентов на поверхности ядерных телец проводили с помощью непрямого иммуноокрашивания со вторыми антителами, конъюгированными с коллоидными частицами золота. Для коилина, одного из маркерных белков телец Кахала и ТГЛ, характер распределения на поверхности сфер и ТГЛ, изолированных из ооцитов голубя и лягушки соответственно, существенно различался. Так, распределение наночастиц, отражающее характер распределения исследуемого антигена, для сфер было равномерным по всей поверхности. В случае ТГЛ количество наночастиц, конъюгированных с антителами, на единицу поверхности было значительно меньше. Таким образом, низковольтная СЭМ представляет собой удобный инструмент для анализа топографии изолированных ядерных телец и позволяет охарактеризовать распределение антигенов на их поверхности.

Работа выполнена при технической поддержке РЦ «Хромас» и МРЦ по направлению «Нанотехнологии» (С.-Петербургский государственный университет).

РНК-КОМПОНЕНТА ПРОТЕАСОМ СОДЕРЖИТ МАЛЫЕ НЕКОДИРУЮЩИЕ РНК. А. С. Цимоха, В. А. Кулличкова, Ю. Я. Зайкова, Н. А. Барлев. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, atsimokha@mail.cytspb.rssi.ru

Большинство процессов в клетке находится под контролем убиквитин-протеасомной системы за счет избирательной деградации ключевых белков-регуляторов. Протеолитическим ядром этой системы является протеасома. Функции протеасом в клетке, однако, не ограничиваются регулируемым протеолизом. Предполагается также участие протеасом в контроле над экспрессией генов на разных уровнях — в регуляции стабильности РНК в клетке за счет эндогенонуклеазной активности комплексов, а также роль протеасом в регуляции транскрипции при участии 19S-регуляторов.

Мы обнаружили, что при выделении и очистке протеасом как из цитоплазмы клеток, так и из ядер соочищает-

ся набор малых РНК, которые на электрофорограмме представлены дискретным набором малых РНК с размежами 20—300 нуклеотидов. Мечение РНК-компоненты протеасом по 3'-концу 5'[³²P]рСр Т4 РНК-лигазой подтвердило данные электрофоретического разделения ассоциированных с протеасомами РНК. В настоящее время функциональная значимость некодирующей области генома становится все более очевидной. Так, например, микро-РНК негативно регулируют экспрессию генов и принимают участие в развитии, дифференцировке, пролиферации и апоптозе клеток, а также выполняют важную роль в процессе опухолевой трансформации. Микро-РНК обеспечивают в организме тонкую подстройку синтеза белка и играют весьма существенную роль в биологических процессах клетки с момента дифференцировки до момента ее старения.

Мы показали методом гибридизации с микрочипами, что некоторая часть РНК-компоненты протеасом принадлежит к семейству микро-РНК. Данные qPCR-анализа микро-РНК, ассоциированных с протеасомами из различных клеточных линий, свидетельствуют в пользу специфического связывания микро-РНК с протеасомами. Мы обнаружили, что в ответ на повреждения ДНК происходит изменение набора ассоциированных с протеасомами микро-РНК. Интересно, что генотоксический стресс приводит к увеличению в РНК-компоненте протеасом количества микро-РНК, участвующих в регуляции клеточного цикла и ДНК-репарации, и это свидетельствует о потенциальной биологической роли ассоциированных с протеасомами микро-РНК в клеточном ответе на повреждения ДНК. В настоящей работе, таким образом, мы исследовали еще одну функциональную особенность протеасом, показав, что протеасомы могут связать специфические микро-РНК.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-15-00816) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

НАЛИЧИЕ КОГЕЗИНОВ ОБЯЗАТЕЛЬНО ДЛЯ КОГЕЗИИ? © В. Д. Черепанинцев,^{1,2} О. А. Жиронкина,^{1,2} О. С. Стрелкова,^{2, 3} С. Ю. Курчашова,² И. И. Киреев.^{1, 2}
¹Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, temchromatinlab@gmail.com, ²Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова и ³Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

Сложно организованный, разделенный на независимо функционирующие домены хроматин высших эукариот можно разделить на две фракции: раннепреплицируемый эухроматин, содержащий в себе большое количество активных генов, и позднепреплицируемый гетерохроматин, основу которого составляют различные повторяющиеся элементы генома. Как эу-, так и гетерохроматин имеют иерархическую организацию: 10-нанометровые нуклеосомные фибрillы образуют 30-нанометровые нити, которые в свою очередь дают структуры высшего порядка — хромонемы — в виде 130—230-нанометровых переплетающихся тяжей эухроматина или высококон-

денсированные домены пристеночного и околоядрышкового хроматина. Репликативное мечение EdU в клетках HT1080 с последующим выявлением включенного предшественника на электронно-микроскопическом уровне показало, что заметных изменений в организации хромонем и крупных доменов пристеночного гетерохроматина до и после репликации нет. Однако две сестринские хроматиды сразу после репликации удерживаются рядом друг с другом до начала профазной компактизации специализированным комплексом — когезином, состоящим из димера Smc1—Smc3 и двух дополнительных субъединиц Scc1 и Scc3. Следовательно, две сестринские хроматиды морфологически организованы в те же хромонемы и гетерохроматиновые блоки, что и одна хроматида до репликации. В интерфазе сестринские хроматиды локально сегрегируют как минимум для обеспечения посадки нуклеосом и независимой работы генов. Каковы особенности установления когезии и сегрегации в хроматине с различным структурно-функциональным состоянием у высших эукариот, остается невыясненным. Ответ на вопрос осложняется также тем, что роль когезинов не ограничивается когезией, как предполагалось ранее. Не менее важную роль они играют в организации субдоменов хроматина вне связи со сближением сестринских хроматид, но также участвуя в организации трансвзаимодействий регуляторных элементов генома. Используя SIM-микроскопию и иммуноэлектронную микроскопию, мы охарактеризовали особенности связывания когезинового комплекса с рано- и позднепреплицируемым хроматином на различных стадиях клеточного цикла в клетках человека и мыши. В клетках человека HT1080 и HeLa большое количество когезинов связано с эухроматином, но они практически не выявляются в гетерохроматине ни во время, ни даже после репликации, что говорит о вероятности организации когезии в этих районах по не зависимому от когезина механизму. Например, сразу после репликации сестринские хроматиды гетерохроматинового домена компактизуются, образуя единый домен, и в силу самой компактизации не могут сегрегировать друг от друга. В результате нет необходимости их связывать с помощью когезинов. В клетках мыши линии 3T3 в отличие от клеток человека когезины локально аккумулируются в межстадиях репликации как в ранней, так и поздней стадиях S-фазы, причем лишь временно, на период репликации. По окончании репликации они, как и в клетках человека, остаются связанными с эухроматином и практически отсутствуют в гетерохроматине.

Таким образом, когезия сестринских хроматид не всегда требует наличия большого количества когезинов, по крайней мере в гетерохроматических районах, и связанные друг с другом сестринские хроматиды образуют морфологически не отличимые от нереплицированных одиночных хроматид структуры хроматина.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-00885).

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ПЛОИДНОСТЬЮ, РАЗМЕРОМ ГЕПАТОЦИТОВ И СОДЕРЖАНИЕМ В НИХ ГЛИКОГЕНА В НОРМАЛЬНОЙ И ЦИРРОТИЧЕСКОЙ ПЕЧЕНИ КРЫС. © А. Ю. Честнова, Н. Н. Безбородкина, А. В. Малова, Б. Н. Кудрявцев. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Важным механизмом поддержания постоянного уровня глюкозы в крови является способность клеток пarenхимы печени синтезировать гликоген из глюкозы после приема пищи и расщеплять его в соответствии с требованиями организма. Значительную роль в регуляции этих процессов играют тканевые и клеточные факторы (Servillo et al., 2009). Установлено, что содержание гликогена в гепатоцитах во многом определяется локализацией клеток в дольке печени, степенью их пloidности, а также фазой клеточного цикла, в которой они находятся (Куряевцев и др., 1979; Rajvanshi et al., 1998; Teutsch et al., 1999). При циррозе происходит значительная гибель гепатоцитов, а оставшаяся их часть из-за нарушений кровообращения в печени вынуждена выполнять свои функции в условиях недостаточного снабжения кислородом и питательными веществами. В связи с этим остается неясным, сохраняется ли взаимосвязь между пloidностью, размером клеток и их глюкостатической функцией в цирротической печени.

В данной работе была исследована зависимость содержания гликогена в гепатоцитах от степени их пloidности и сухой массы через разные интервалы времени после введения глюкозы голодным животным в норме и при циррозе. Работа проведена на двух группах белых беспородных самцов крыс (по 9 в каждой). Животных одной группы (опытной) в течение 6 мес подвергали хроническому ингаляционному воздействию паров CCl_4 для получения цирроза печени. Животных другой группы, которые не подвергались воздействию CCl_4 , использовали в качестве контроля.

Через 1 нед после прекращения отравления крыс опытной и контрольной групп подвергали голоданию в течение 48 ч (вода *ad libitum*) для истощения запасов гликогена в печени. После этого животным регос с помощью катетера вводили 30%-ный раствор глюкозы из расчета 4 г на 1 кг массы тела. Сразу после прекращения голодания и затем через 10 и 60 мин после введения глюкозы крыс декапитировали, а извлеченную печень использовали для приготовления мазков изолированных гепатоцитов на предметных стеклах. На препаратах-мазках измеряли сухую массу, содержание гликогена и ДНК в изолированных гепатоцитах, используя комбинированный цитофотометрический метод, позволяющий последовательно определять эти параметры в одной и той же клетке. Содержание гликогена и ДНК измеряли цитофлуориметрическими методами, а сухую массу гепатоцитов определяли с помощью интерференционной микроскопии.

Показано, что в цирротической печени за счет увеличения доли высокопloidных гепатоцитов средняя пloidность гепатоцитов составила 5.06с, что на 6.5 % больше нормы. Преобладающим классом пloidности гепатоцитов в цирротической печени, как и в нормальной печени, были одноядерные тетраплоидные (4с) гепатоциты. Зависимость между размером гепатоцитов и содержанием в них гликогена исследовали для каждого класса пloidности одноядерных (2с, 4с и 8с) и двуядерных (2с × 2 и 4с × 2) гепатоцитов. Установлено, что в ходе гликогенеза содержание гликогена в гепатоцитах и их сухая масса как в норме, так и при патологии изменяются пропорционально дозе генов. В нормальной печени содержание гликогена в одноядерных и двуядерных гепатоцитах различной пloidности положительно коррелирует с размерами клеток. В цирротической печени подобная зависимость отсутствует, что, возможно, связано с нарушением долькового строения органа.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-32378-мол_а).

ВЛИЯНИЕ МЕТАЛЛОВ НА СТРУКТУРНУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ КОМПЛЕКСОВ ДНК С НЕГИСТОНОВЫМ БЕЛКОМ HMGB1 В ПРИСУТСТВИИ ЛИНКЕРНОГО ГИСТОНА H1. © Е. В. Чихиржина,¹ Е. И. Костылева,¹ Т. Ю. Старкова,¹ А. М. Поляничко.^{1,2} ¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, chikhir@gmail.com, и ²Физический факультет С.-Петербургского государственного университета.

Исследование механизмов взаимодействия ДНК с такими ключевыми белками хроматина, как линкерный гистон H1 и негистоновый белок HMGB1, играет важную роль в понимании структурной организации хроматина. Белок HMGB1 относится к группе белков с высокой электрофоретической подвижностью (High Mobility Group). Этот белок взаимодействует с ДНК в межнуклеосомной области. С этим участком также связан и линкерный гистон H1. Большой интерес вызывает исследование взаимоотношений между этими белками и влияния различных лигандов на их взаимодействие с ДНК. Некоторые авторы предполагают возможную конкуренцию между H1 и HMGB1 за связывание с отдельными участками ДНК. Предполагается, что, конкурируя с H1 за связывание с локальными областями хроматина, HMGB1 может влиять на их функциональную активность. По мнению других авторов, а также по данным, полученным нами ранее, эти белки, скорее, выполняют общую функцию. Оба белка играют важную роль в функционировании хроматина, так как принимают непосредственное участие в образовании сложных функционально значимых комплексов.

В работе методами спектроскопии поглощения и кругового дихроизма (КД) в ультрафиолетовой и инфракрасной областях спектра исследованы комплексы ДНК с негистоновым белком хроматина HMGB1 и гистоном H1 в присутствии ионов марганца. Было показано, что связывание белка HMGB1 и гистона H1 с ДНК не носит конкурентного характера и обладает признаками кооперативного взаимодействия. Богатый лизином гистон H1 облегчает связывание HMGB1 с ДНК предположительно путем экранирования отрицательно заряженных групп сахара-фосфатного остова ДНК и остатков дикарбоновых аминокислот в С-концевом домене белка HMGB1. Совместное действие белков HMGB1 и H1 стимулирует конденсацию ДНК с образованием анизотропных ДНК-белковых комплексов, характеризующихся ψ -типом спектра КД ДНК. В присутствии обоих белков доминируют взаимодействия в малой бороздке ДНК, вызванные связыванием с HMGB1. Гистон H1 предпочтительно взаимодействует с отрицательно заряженными группами — фосфатными в ДНК и С-концевой последовательностью белка HMGB1, которая состоит 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. Существенную роль при образова-

нии структурноупорядоченных комплексов между ДНК и белками HMGB1 и H1 играют белок-белковые взаимодействия, которые усиливаются в присутствии ионов марганца. С другой стороны, ионы марганца ослабляют ДНК-белковые взаимодействия. Установлено, что ионы марганца в комплексе способны координироваться не только к различным химическим группам в составе ДНК, но и к остаткам дикарбоновых аминокислот белка HMGB1, стимулируя конденсацию ДНК, что и приводит к ослаблению ДНК-белковых взаимодействий в комплексе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-08-01134) и правительства Санкт-Петербурга.

МЕХАНИЗМЫ РАЗБОРКИ ЯДЕРНЫХ ТЕЛЕЦ. © Е. В. Шеваль. Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, sheval_e@belozersky.msu.ru

Жизненный цикл любой клеточной структуры включает в себя не только этап формирования, но и этап разборки. Обычно после завершения формирования структура, реализуя присущую ей биологическую активность, в течение продолжительного времени сохраняет стабильными свои морфофункциональные характеристики, меняя их только в силу необходимости адаптироваться к изменению состояния клетки либо внешних условий. Однако некоторые структуры сразу после завершения формирования начинают разбираться. Примером могут служить проядрышки телофазных ядер. В настоящее время показано, что созревание пре-рРНК в составе проядрышек приводит к их разборке, что хорошо коррелирует с многочисленными наблюдениями последних лет о решающей роли РНК в формировании и поддержании структурной целостности ядерных телец. В настоящей работе для изучения разборки ядерных структур использовали модель так называемых интерфазных проядрышек, которые формируются в нуклеоплазме ядер после их возврата из гипотонической среды, в которой происходит частичная разборка ядрышка, в изотонические условия. С течением времени число интерфазных проядрышек в ядрах постепенно уменьшается, хотя отдельные тельца могут наблюдаваться даже через 6 ч после возврата клеток в изотонические условия. Прижизненные наблюдения с использованием слитого с EGFP мажорного ядрышкового белка B23 (EGFP-B23) показали, что для большей части проядрышек характерна ограниченная диффузия, т. е. эти структуры не способны к направленному переносу материала в ядрышки. Трехмерная реконструкция на основе серий ультратонких срезов показала, что отдельные проядрышки окружены плотной сетью тяжей конденсированного хроматина, которые и могут служить фактором, ограничивающим диффузию тельца по нуклеоплазме. События слияния проядрышек друг с другом и с ядрышками наблюдаются преимущественно в течение первого часа после возврата клеток в изотонические условия, когда расстояния между проядрышками относительно невелики. На поздних сроках событий слияний наблюдать не удалось. Таким образом, подвижность проядрышек и слияния их друг с другом и с ядрышками имеют преимущественно стохастический характер и вносят ограниченный вклад в процессы восстановления структуры яд-

рышка после гипотонической обработки. Содержание EGFP-B23 в интерфазных проядрышках постепенно уменьшается, что сопровождается постепенным накоплением белка в ядрышках. С помощью метода FRAP показано, что EGFP-B23 связан с проядрышками не стабильно, а обменивается с фракцией нуклеоплазматического белка. Это позволяет говорить о том, что перемещение белка в ядрышки происходит путем диффузии по мере разборки проядрышек. С помощью гибридизации *in situ* показано, что этот процесс может быть связан с изменением содержания различных пре-рРНК в проядрышках. Также на процесс разборки может влиять синтез новых пре-рРНК в ядрышках, так как ингибирование синтеза рРНК с помощью низких концентраций актиномицина Д приводит к замедлению разборки проядрышек. В последнем случае освобождающийся из проядрышек белок не связывается с ядрышками, а распределяется по нуклеоплазме. Таким образом, процесс диффузионного перемещения белка зависит от двух процессов — уменьшения числа сайтов связывания в проядрышках и увеличения числа сайтов связывания в ядрышках. Важно, что формирование интерфазных проядрышек не требует энергии, в то время как их разборка блокируется при недостатке АТР.

ПОСТРОЕНИЕ КАРТ КОНТАКТА ХРОМОСОМ С ЯДЕРНОЙ ЛАМИНОЙ В ГЕРМИНАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ САМЦОВ *DROSOPHILA MELANOGASTER*. © Ю. Я. Шевальев,¹ О. М. Оленкина,¹ Ю. А. Абрамов,¹ А. В. Пиндюрин,² Д. А. Максимов,² С. Н. Белякин.² ¹Институт молекулярной генетики РАН, Москва, shevelev@img.ras.ru, и ²Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск.

Подвижность интерфазных хромосом частично ограничена из-за связывания их определенных участков (так называемых ламиноассоциированных доменов — ЛАДов) с ядерной оболочкой (Guelen et al., 2008). Ранее ЛАДы были картированы у дрозофилы только в культуре клеток эмбрионального происхождения Кс (van Bemmel et al., 2010). Методом DamID-seq, модифицированным для применения в определенных тканях, мы получили полногеномный профиль связывания ламина в ранних сперматоцитах дрозофилы. Сравнение профилей связывания ламина в сперматоцитах и клетках Кс выявляет как наличие общих между этими типами клеток ламиноассоциированных доменов, так и существование вариабельности между разными клетками. Провалы в профиле связывания ламина в ранних сперматоцитах частично совпадают с нахождением семенник-специфичных генов в этих участках генома, что подтверждает обнаруженную ранее корреляцию между экспрессией генов и утратой ими контакта с ядерной оболочкой.

НОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ *HOMO SAPIENS* С УЧАСТИЕМ МИНОРНЫХ ИЗОФОРМ СУБЪЕДИНЩИЦЫ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ II POLR2J И ЯДЕРНЫХ БЕЛКОВ EIF3M β И COMMD4D. © Е. К. Шематорова, Д. Г. Шпаковский, Ю. В. Долудин, И. Ю. Словохотов, Г. В. Шпаковский. Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, gvs@ibch.ru

Одним из важнейших молекулярных механизмов прогрессивной эволюции сложных геномов являются сег-

ментные дупликации, способствующие возникновению новых генных семейств. С точки зрения антропогенеза наибольший интерес представляют относительно недавние дупликации, специфичные для человека и высших обезьян (Lesser & Great Apes). Ранее мы показали, что появление и совершенствование генетической структуры генов *POLR2J* системы транскрипции и *PMS2* системы репарации MMR четко коррелируют с основными этапами биологической эволюции высших приматов, вследствие чего количество генов этих семейств и их распределение на хромосоме 7 являются достоверными молекулярными маркерами антропогенеза. Нами установлено, что важнейшими продуктами экспрессии специфичных для человека генов *POLR2J2* и *POLR2J3* являются особые, минорные (по сравнению с классической hRPB11a [POLR2J], 117 а. о.) субъединицы РНК-полимеразы II hRPB11b α и hRPB11c α (115 а. о.), которые входят в состав специфических РНК-полимеразных комплексов *Homo sapiens* и участвуют в координации транскрипции с последующими этапами генной экспрессии (транспорт мРНК из ядра в цитоплазму к транслирующим рибосомам) и рядом других молекулярно-биологических процессов клетки (репликация и репарация ДНК).

Среди основных партнеров минорных субъединиц hRPB11b α и hRPB11c α оказались новые, ранее не описанные компоненты протеома человека, названные нами eIF3m β и COMMD4d, которые в отличие от родственных им известных белков eIF3m α (GA17) и COMMD4 способны проникать в ядра клеток. С помощью дрожжевой двухгибридной системы (YTH) мы провели практически исчерзывающий поиск партнеров в протеоме человека (эмбриональный мозг и клеточная линия Jurkat) этих новых, впервые охарактеризованных нами белков *H. sapiens*. Большинство из обнаруженных с помощью генетического метода YTH белок-белковых взаимодействий (eIF3m β — с eIF3f, RAIN, CTNNAL1, BST2, GMAP, MED21, PSME1, RPN6, EXOC7 и CCT3; COMMD4 — с ING5, 14-3-3, CIN85 и CCT4) были подтверждены с помощью биохимических подходов, таких как соосаждение предполагаемых белков-партнеров из экстрактов трансфицированных клеточных линий человека или после их совместной гетерологичной экспрессии в *Escherichia coli*. Выявленные в этих опытах белки были попарно (рецепторно) проверены на их взаимодействие с уже установленными нами компонентами интерактома (в тех же тканях) минорных субъединиц hRPB11b α и hRPB11c α РНК-полимеразы II человека. Кроме того, мы сравнили впервые установленные нами интерактомы eIF3m β и COMMD4d с партнерами известных, классических изоформ этих белков (eIF3m α и COMMD4) — как взятыми из литературы, так и обнаруженными нами в параллельных опытах с использованием YTH. В результате впервые определены те сигнальные пути клетки, в регуляции которых участвуют новые комплексы генной экспрессии *H. sapiens*, содержащие специфичные для человека варианты субъединицы POLR2J и особые изоформы белков eIF3m и COMMD4.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-01485).

ПЕРЕВОД СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ИЗ СИСТЕМЫ IN VIVO В УСЛОВИЯ IN VITRO МОЖЕТ ПРИВОДИТЬ К ПОЯВЛЕНИЮ КЛЕТОЧНЫХ ВАРИАНТОВ

С ОТКЛОНЕНИЯМИ ОТ НОРМЫ. © М. А. Шилина, В. И. Земелько, Т. М. Гринчук. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, shili-mariya@yandex.ru

Одним из наиболее перспективных источников материала для заместительной клеточной терапии в настоящее время являются эндометриальные мезенхимные стволовые клетки (эМСК). Для использования эМСК в медицинской практике необходимо, чтобы клетки имели нормальный, неперестроенный кариотип. Методы терапевтического использования клеток предполагают наращивание клеточной массы в условиях *in vitro*. Однако сам перевод клеток из системы *in vivo* в систему *in vitro* является стрессовым фактором для клеток и может привести к генетическим изменениям, в том числе и на уровне кариотипа. На сегодняшний день нет однозначного ответа на вопрос о стабильности кариотипического набора эМСК при переводе клеток в условия *in vitro*.

Целью данной работы было проанализировать структуру кариотипа эМСК на ранних этапах культивирования, после перевода клеток в культуру. В качестве объектов исследования были использованы эМСК человека четырех независимых линий, полученных из десквимированного эндометрия менструальной крови. После перевода клеток из системы *in vivo* в *in vitro* их культивировали при одинаковых, стандартных условиях и анализировали на 5—7-м пассаже. Кариологический анализ проводили с использованием метода окраски метафазных хромосом дифференциально на G-диски. Хромосомы идентифицировали в соответствии с «Атласом хромосом человека» (Мамаева, 2002).

Анализируемые эМСК характеризовались набором CD-маркеров, характерных для клеток, имеющих мезенхимный стромальный фенотип, а также частичной экспрессией поверхностных маркеров плорипотентности.

В результате кариотипирования установлено, что на ранних этапах культивирования *in vitro* (пассажи 3—7) во всех линиях наряду с клетками, имеющими нормальную структуру кариотипа, были обнаружены клетки с отклонениями от нормы. Выявленные изменения были связаны с изменением как числа хромосом, так и морфологии некоторых из них. Общим для клеток трех линий было наличие поломок хромосомного материала, а некоторые из них во всех трех линиях затрагивали одинаковые хромосомы. Изменения в хромосомах 1—3 можно отнести к неслучайным, так как эти хромосомы были вовлечены в поломки в трех линиях из четырех. Другие два типа изменений были связаны с нерасхождением хромосом в митозе, что приводило к возникновению нетипичных изохромосом и межхромосомных ассоциаций. В эти типы изменений также вовлекались определенные хромосомы набора — 13—15. На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что перевод клеток из условий *in vivo* в *in vitro* является стрессовым фактором, который может привести к нарушению структуры генома на уровне кариотипа. Вовлечение в перестройки определенных хромосом кариотипического набора позволяет говорить о наличии в клетках человека сайтов повышенной ломкости в хромосомах 1—3.

ЯДРЫШКОПОДОБНЫЕ ТЕЛЬЦА В GV-ООЦИТАХ МЫШИ ДЕПОНИРУЮТ КЛЮЧЕВЫЕ БЕЛКИ ЯДРЫШЕК. © К. В. Шишиова,¹ Е. А. Лаврентьева,^{1,2} Д. Ш. Джалилова,^{1,3} О. В. Зацепина.¹ Институт биоорганической хи-

мии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, ²Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова и ³Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

Постнатальное развитие ооцитов млекопитающих сопровождается функциональной и структурной реорганизацией ядрышкового аппарата, которая завершается в предовуляторных (GV-ооцитах, germinal vesicle) появлением крупных (до 10 мкм в диаметре) телец, получивших название ядрышкоподобных телец (ЯПТ, NLBs — nucleolus-like bodies). ЯПТ отличаются от ядрышек соматических клеток по морфологии: в данных структурах не выявляются структурные компоненты ядрышек, такие как фибрillлярные центры, плотный и гранулярный компоненты. Центральная часть ЯПТ представляет собой плотноупакованный тонкофибрillлярный материал неустановленной природы. Синтез пре-рРНК (47S предшественник рибосомной РНК) происходит только на поверхности ЯПТ, а белки ядрышка, участвующие в процессинге, локализованы также на поверхности структуры. Функция данных образований не установлена, однако известно, что удаление ЯПТ из ооцитов мыши препятствует нормальному развитию эмбриона после оплодотворения. Несмотря на то что ядрышкоподобное тельце в ооцитах млекопитающих являлось объектом многих исследований на протяжении нескольких десятков лет, химическая природа его основного материала остается неизученной. Ранее в нашей лаборатории с помощью красителя ФИТЦ (флуоресцеин-5-изотиоцианат) было показано наличие белков в ЯПТ GV-ооцитов мыши. Целью данной работы является анализ состава ядрышкоподобных телец ооцитов мыши. Обработка протеолитическими ферментами является одним из подходов для выявления скрытого антигена в образцах перед иммуноцитохимической реакцией. В связи с этим для выяснения возможного присутствия белков ядрышка в ЯПТ была разработана методика, основанная на частичном протеолитическом расщеплении белков в ооцитах ферментом протеиназой K.

В результате наших экспериментов среди белков внутренней массы ЯПТ впервые идентифицированы ключевые белки ядрышка: UBF (upstream-binding factor, кофактор РНК-полимеразы I), фибрillарин, NPM1/нуклеофозмин, C23/нуклеолин (факторы процессинга пре-РНК), а также рибосомный белок RPL26. Ядерных белков, таких как SC35 (сплайсинг-фактор), NOBOX (транскрипционный фактор), топоизомераза IIβ (фермент-изомераза), HP1α (белок гетерохроматина) и гистон H3, не было найдено в составе ЯПТ. Полученные результаты свидетельствуют о накоплении в ЯПТ белков ядрышка, участвующих в разных этапах биогенеза рибосом, но временно не выполняющих свои функции. В пользу этого заключения свидетельствуют литературные данные о том, что активные рибосомные гены выявляются только на поверхности, но не внутри ЯПТ, а также наши собственные наблюдения об отсутствии рибосомной РНК в ядрышкоподобных тельцах. Запасаемые в ЯПТ белки, основными функциями которых являются различные этапы процессинга пре-рРНК, могут быть использованы для построения новых рибосом в эмбрионах после оплодотворения ооцита. Предположительно такой механизм может быть необходим для ускоренного возобновления синтеза белка в эмбрионе до активации транскрипции рДНК. В связи с этим удалением белков биогенеза рибосом можно объяснить неспособность эмбриона к нормальному развитию после элиминирования ЯПТ из ооцита.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской научной фонда (проект 14-34-00033).

РОЛЬ GAR-ДОМЕНА В ОБЕСПЕЧЕНИИ ЯДРЫШКОВОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ ФИБРИЛЛАРИНА. © М. Ю. Шубина, Я. Р. Мусинова, Е. В. Шеваль. Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, musinova.yana@gmail.com

Фибрillарин является одним из наиболее хорошо изученных ядрышковых белков, вовлеченных в процессы созревания и метилирования пре-рРНК, сборки рибосом. Этот белок демонстрирует чрезвычайно высокую консервативность от архей до высших эукариот. Исключением является N-концевой домен, который присутствует только у эукариот. Проведенный биоинформационный анализ показывает, что этот домен обладает чрезвычайно высокой гетерогенностью, но у большинства эукариот он обогащен остатками глицина и аргинина (Glycine-Arginine-Rich or GAR motif). Однако у некоторых организмов N-концевой домен может отсутствовать, быть обогащенным остатками лизина или отрицательно заряженных аминокислот. Роль GAR-домена в функционировании фибрillарина изучена слабо. В работе проанализирована локализация фибрillарина, GAR-домена и фибрillарина с делецииным GAR-доменом (Δ GAR). Для анализа белок и его фрагменты были слиты с EGFP. Фибрillарин накапливается преимущественно в плотном фибрillлярном компоненте (ПФК) ядрышка, в меньшей степени в гранулярном компоненте (ГК) ядрышка и в нуклеоплазме. После делеции GAR-домена белок слабо накапливается в ПФК, его содержание в нуклеоплазме и цитоплазме увеличивается. GAR-домен локализуется в ГК ядрышка и нуклеоплазме, но не детектируется в цитоплазме. Последнее говорит о том, что этот домен фибрillарина играет роль сигнала ядерной локализации. Накопление GAR-домена в ГК отчетливо видно и после сегрегации компонентов ядрышка под действием актиномицина D. В митозе GAR-домен колокализовался с нуклеофозмином. Таким образом, GAR-домен способствует накоплению фибрillарина в ядре и ядрышке, но точное позиционирование белка зависит от остальной части белка. Накопление в ГК может иметь функциональное значение, так как приводит к повышению концентрации белка внутри структуры, т. е. увеличивает вероятность взаимодействия с функциональными сайтами в ПФК. Ранее такой тип накопления был описан нами для сигналов ядрышковой локализации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-01650).

СОЗДАНИЕ ХИМЕРНЫХ БЕЛКОВ НА ОСНОВЕ CRISPR/Cas9 ДЛЯ НАПРАВЛЕННОГО ПОДАВЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ. © О. Ю. Шувалов^{1,2}, А. В. Петухов², А. С. Ермаков², Н. А. Барлев^{1,2}. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и ²С.-Петербургский государственный технологический институт (Технический университет).

В природных условиях молекулярная система на основе CRISPR/Cas (от англ. CRISPR — Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated) служит для защиты бактерий и архей от бактериофагов. Данная система обеспечивает прокариотам приобретенный иммунитет и является аналогом РНК-интерференции, имеющей место в эукариотических клетках.

В настоящее время система на основе CRISPR/Cas9 активно используется исследователями в качестве инструмента для направленного редактирования генома эукариот. Данная система используется и постоянно совершенствуется для создания нокаутов, визуализации определенных участков генома, получения обратимых нокаутов и т. д.

В целях геномного редактирования CRISPR/Cas9 является двухкомпонентной системой и состоит из бактериальной эндонуклеазы Cas9 и синтетической направляющей РНК (guide RNA), обеспечивающей специфичную доставку Cas9 к определенному участку генома.

В 2013 г. появились первые данные о возможности использования модифицированной CRISPR/Cas9-системы как для активации, так и для подавления экспрессии генов. Для этого исследователи использовали дефектный по нуклеазной активности белок Cas9 (dCas9), слитый с эффекторными белками, обладающими ферментативной активностью.

В данной работе мы оценили возможность использования новых химерных вариантов белка dCas9 (dCas9 в слиянии с эффекторными белками) для направленного подавления транскрипции. Для этого мы на основе РНК, выделенной из клеточной линии НСТ116 (колоректальный рак человека), амплифицировали последовательности нескольких генов, белковые продукты которых участвуют в эпигенетической регуляции экспрессии. Далее нами были созданы векторы, несущие последовательности определенных участков данных генов в слиянии с dCas9, а также векторы для экспрессии guide-RNA, специфичные к различным участкам EGFP.

Полученными эпизомальными векторами мы трансфирировали клеточную линию U2OS (остеосаркома человека), стабильно экспрессирующую EGFP. Далее мы производили оценку эффективности подавления экспрессии EGFP на основе снижения интенсивности зеленого флуоресцентного сигнала.

Направленное специфическое подавление экспрессии генов посредством CRISPR/Cas9-системы может быть использовано как для изучения функциональной роли конкретных белков (создание эпигенетических нокаутов), так и в прикладных целях (потенциальный инструмент для генной терапии). Поэтому результаты данной работы имеют как фундаментальное, так и прикладное значение.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта правительства РФ № 11.G34.31.0069 от 21.10.2011 и Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 14-04-32242-мол_а и 13-04-01024-а).

ЭКСТРАКОПИРОВАНИЕ ДЛИННОГО ПЛЕЧА ХРОМОСОМЫ 8 В КАРИОТИПЕ КЛЕТОК KG-1 ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА ЧЕЛОВЕКА. © Т. К. Яков-

лева, В. И. Турилова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, tyak@mail.cytspb.rssi.ru

Специфический хромосомный дисбаланс, связанный с появлением и(или) утратой целых хромосом или их фрагментов, выявлен в большинстве неоплазий человека и является характерной чертой опухолевого генома. Три-сомия и полисомии по хромосоме 8 как единственная аномалия кариотипа, так и в сочетании с перестройками других хромосом часто встречаются в гемобластозах, в том числе в остром миелоидном лейкозе человека (ОМЛ). Показано, что именно дополнительные копии хромосомы 8 обеспечивают клеткам селективные преимущества, приводя к клonalной экспансии и быстрому развитию болезни. С целью изучения динамики кариотипа опухолевых клеток *in vitro* выполнен цитогенетический анализ клеток линии KG-1 (острый миелоидный лейкоз с признаками созревания, FAB M2) с использованием метода окрашивания хромосом на G-диски. Выявлен сложный псевдодиплоидный кариотип ($2n = 46$), в целом соответствующий описанному ранее (Mrozek et al., 2003). В кариотипе клеток KG-1 обнаружено отсутствие одного из нормальных гомологов хромосом 5 и 12, несбалансированные транслокации хромосом der(4)t(4;8)(q31;p21), der(8)t(8;12)(p11;q13), der(17)t(5;17)(q?31;p11.2) и der(20)t(12;20)(?;p13), делеция хромосомы 7 — del(7)(q22q35) — и изодицентрическая хромосома по длинному плечу хромосомы 8 — idic(8)(p11), представленная в двух копиях. Анализ данных, опубликованных с момента получения клеточной линии KG-1, свидетельствует о том, что прогрессия кариотипа в процессе культивирования клеток связана с появлением делеции длинного плеча хромосомы 7, а также с появлением и последующей дупликацией хромосомы idic(8)(p11), что привело к экстракопированию длинного плеча хромосомы 8 (8q) с 3 до 6 копий. Учитывая присутствие в кариотипе ряда клеток микрохромосомы, которая является центромерным районом хромосомы 8, общее число копий центромерного района хромосомы 8 может достигать 7. Согласно базе данных Мителмана по перестройкам хромосом при раке (<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>), изохромосома по длинному плечу хромосомы 8 относится к вторичным аномалиям, наиболее характерным для прогрессии ОМЛ FAB M2. Таким образом, возникающие *de novo* при культивировании клеток KG-1 реаранжировки хромосом имеют опухолеспецифический характер и формируют локальный хромосомный дисбаланс. Среди клеточных линий ОМЛ клетки KG-1 представляют редкий случай экстракопирования 8q. По-видимому, эффект дозы генов, локализованных в экстракопированном районе хромосомы 8 ($8p11 \rightarrow 8qter$), определяет прогрессию клеток KG-1 *in vitro*. Потенциальную роль в поддержании геномной нестабильности в опухолевых клетках может играть локализованный в 8q24.1 ген *C-MYC*. Известно, что повышенная экспрессия гена *C-MYC* вызывает агрегацию теломер и нарушения структуры хромосом, что приводит к появлению нерецепторных транслокаций. Кроме того, deregulation гена *C-MYC* индуцирует численные изменения хромосом как следствие aberrантного синтеза ДНК и дефектов контрольной точки веретена деления. Предлагается обсудить возможные механизмы избирательного экстракопирования хромосом при ОМЛ.