

**ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ И СООБЩЕНИЙ,  
ПРЕДСТАВЛЕННЫХ НА КОНФЕРЕНЦИЮ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ  
«КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ»**

(Санкт-Петербург, 2—6 октября 2017 г.)

НЕКОДИРУЮЩАЯ ДНК И lncRNA (LONG NONCODING RNA). © Л. С. Адонин,<sup>1,2,\*</sup> О. И. Подгорная,<sup>1,2</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и<sup>2</sup>Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, \*leo.adonin@gmail.com

К некодирующей ДНК, которая занимает подавляющую часть геномов высших эукариот, относятся диспергированные повторы (TE, transposable elements) и tandemные повторы (TR, tandem repeats). В дегеномную эру Группа занималась ДНК-связывающими белками, специфичными как для TE, так и для TR. Использовали клонированные фрагменты TE (класс SINE — Alu, B1; класс LINE — L1, CR1).

Показано существование Alu-связывающих белков. В клетках HeLa обнаружены Alu-связывающие белки, получены антитела, определена локализация, на основании МАЛДИ белок идентифицирован как гетеродимер Ku70/80. В настоящее время проводится доказательство физиологического связывания Alu-Ku70/80 *in vivo*. Sp1/Sp3 определены как белки семенников крыс, связывающие промотор в 5'UTR-районе L1 (класс LINE).

С использованием клонированных фрагментов TR теломерсвязывающий белок TRF2 определен как мембрально-связанный. Проводится работа по определению конкретного домена TRF2, ответственного за прикрепление теломер к мембране. С использованием клонированных TR МиSat (минорный сателлит мыши) и HS3 (Human Satellite 3) РНК-хеликаза p68 (DDX5) определена как белок, специфически связывающий сателлитную ДНК, и как компонент нити, связывающий хромосомы в метафазной пластине в связи с присутствием в нити TR. Белок SAF-A/hnRNP-U, ранее известный как связывающий матриксассоциированные районы (Matrix Attachment Regions, MAR), определен как связывающий MaCat (мажорный сателлит мыши), но не МиSat; таким образом SAF-A является белком, избирательно связывающим перицентромерные TR. Связывание *in vitro* зависит от трехмерной структуры, «кривизны» ДНК, т. е. структурно специфическое связывание *in vitro* показано как для РНК-хеликазы p68 (DDX5), так и для SAF-A.

Появление прочитанных геномов дало возможность классифицировать как TR геномов млекопитающих (методика отработана на хорошо собранном геноме мыши), так и TE в плохо изученных геномах беспозвоночных.

Несколько лет назад (взрыв работ в 2012 г.) стало понятно, что не менее 80 % геномов высших эукариот

транскрибируется, т. е. транскрибируются большинство TE и TR, которые долго считали инертной частью генома. Транскрипты TE и TR составили класс длинных некодирующих РНК (lncRNA, long noncoding RNA). Стало понятно, что lncRNA играют принципиальную роль в регуляции ансамблей генов. Особенно важны транскрипты разных TE (lncRNA) в эмбриональном развитии, при поддержании плюрипотентности, детерминации зародышевых листков и дальнейшей дифференцировке.

Мы показали, что при дифференцировке происходит транскрипцияperiцентромерной, но не центромерной сатДНК как в разных клетках человека, так и на модели эмбриональных стволовых клеток мыши. Продолжается работа по картированию выявленных *in silico* TR разных видов и их транскриптов.

Мы показали обогащение конститутивного гетерохроматина, во-первых, IAP (ERV 2-й класс), который определяет состояние плюрипотентности; во-вторых, определенным фрагментом конца 2-й ORF и 3'UTR-района L1. Этот фрагмент является основным компонентом Cot lncRNA соматических клеток. Транскрипты класса LINE (lncRNA) являются одними из самых динамичных в эмбриональном развитии. На модели партеногенетического поколения паразитической третматоды мы показали, что, во-первых, кодирующие обратную транскриптазу (RT, reverse transcriptase) и некодирующие, спейсерные, участки TE CR1 (класс LINE) картируются в разных участках генома: спейсерные — в коститутивном, RT — в факультативном гетерохроматине; во-вторых, более того, RT и спейсеры находятся в разных транскриптах (lncRNA), которые в сумме составляют ~80 % транскриптома повторов.

Многолетние усилия Группы некодирующей ДНК направлены на то, чтобы выявить программу морфогенеза, которая скрыта в повторах классов TE и TR. Определение роли конкретных TE и TR дополнит распространенную каскадную теорию Гилберта, основанную только на генах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 15-15-20026) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

**РАЗЛИЧИЯ В СИСТЕМЕ РЕПАРАЦИИ ПОТОМКОВ ЭМСК ЧЕЛОВЕКА, ПЕРЕЖИВШИХ СУБЛЕТАЛЬНОЕ**

ТЕПЛОВОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ В РАЗЛИЧНЫХ ФАЗАХ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА, ПО ДАННЫМ ТРАНСКРИПТОМНОГО АНАЛИЗА. © Л. Л. Алексеенко,<sup>1</sup> О. В. Анацкая, М. А. Шилина, А. Е. Виноградов, Т. М. Гринчук, Н. Н. Никольский. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, <sup>1</sup>al.l.l@mail.ru

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) существуют во всех тканях человека. Способность МСК секретировать противовоспалительные факторы и дифференцироваться в разных направлениях, превращаясь в разные типы клеток, придает им особенную ценность для регенеративной медицины и клеточной терапии. Располагаясь в тканевых нишах с оптимальным физиологическим микроокружением, МСК сохраняют генетическую стабильность и состояние пролиферативного покоя. При культивировании *in vitro*, необходимом для получения большой биомассы клеток, так же как и в процессе самой трансплантации клеточного продукта, МСК часто подвергаются стрессовым воздействиям, приводящим к потере генетической стабильности, преждевременному старению и непригодности для клинического применения. Из литературных данных известно, что клетки в разных фазах клеточного цикла могут по-разному реагировать на стрессовое воздействие. В связи с этим целью настоящей работы было исследовать отличия в работе репарационной системы у потомков МСК эндометрия человека (эМСК), переживших сублетальный тепловой шок (СТШ) в различных фазах клеточного цикла. Для этого мы сопоставили данные полнотранскриптомного секвенирования для клеток асинхронной и синхронизированной в фазе G<sub>0</sub>—G<sub>1</sub> культуры эМСК, переживших сублетальное тепловое воздействие (45 °C в течение 30 мин) через 6 пассажей культивирования при стандартных условиях. Основное внимание было уделено генным модулям репарации и интерактантам главных регуляторов репарации разрывов ДНК. Влияние СТШ на репарационную систему клеток асинхронной культуры проявлялось в снижении активности основных регуляторов репарации одинарных и двойных разрывов ДНК — ATM,CHK2, ATR,CHK1, BRCA1 и BRCA2, в компенсаторной индукции регулятора репарации одинарных разрывов — PARP1 и репарации теломеразной ДНК — PML1. В то время как для потомков клеток, синхронизированных в фазе G<sub>0</sub>—G<sub>1</sub>, активность регуляторов репарации и их интерактантов практически не отличалась от контрольных клеток. Таким образом, биоинформационный анализ транскриптома показал, что репарационная система потомков клеток, переживших тепловой шок в фазе G<sub>0</sub>—G<sub>1</sub>, отличается от репарационной системы асинхронной культуры, пережившей аналогичное воздействие, и сходна с контрольными клетками.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068).

ЯДРЫШКОВЫЙ АППАРАТ В ЯДРАХ ПИТАЮЩИХ КЛЕТОК ЯИЧНИКОВ PROTOPHORMIA TERRAENOVAE (R-D) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE). © Т. В. Ананина,<sup>1</sup> А. В. Свирко, К. Е. Усов. Научно-исследовательский институт биологии и биофизики Томского государственного университета, <sup>1</sup>tany\_a@list.ru

Ядрышко — наиболее крупный и пластичный домен интерфазного ядра, структура и размеры которого корре-

лируют с транскрипционной активностью клетки и изменяются в ответ на многие внешние воздействия. С одной стороны, позиция ядрышек в ядре зависит от локализации ядрышкообразующих районов хромосом, а с другой стороны, изменение размеров и количества ядрышек должно влиять на распределение окружающего ядрышки хроматина и на пространственную организацию интерфазного ядра в целом. Особенно значительных изменений в пространственной локализации ядрышкового аппарата стоит ожидать при смене политетенной организации хроматина на полиплоидную с ретикулярной структурой хроматина. Такие изменения происходят в ядрах питающих клеток яичников некоторых видов двухкрылых насекомых. Так, на ранних стадиях оогенеза в ядрах питающих клеток *Protophormia terraenovae* происходит эндоредупликация ДНК и формируются политетные хромосомы. Затем хроматиды спирализуются, отсоединяются друг от друга и политетные хромосомы распадаются на эндомитотические хромосомы. Дальнейшая полиплоидизация ядра происходит в результате эндомитозов и сопровождается конденсацией / деконденсацией (вероятно, частичной) хроматид.

Мы изучили изменение локализации и пространственной организации генов 18S rРНК и белка плотного фибриллярного компонента — фибрillарина — в питающих клетках яичников на разных стадиях оогенеза у *P. terraenovae*. Ядрышкообразующая хромосома *P. terraenovae* была определена методом FISH зонда рДНК на политетные хромосомы питающих клеток. Сигнал зонда локализовался на плечах самой маленькой хромосомы набора — хромосомы 1. С помощью 3D FISH 18S рДНК, иммунофлуоресцентного окрашивания фибрillарина и компьютерной обработки оптических срезов были получены 3D-модели ядрышкового аппарата в ядрах питающих клеток с разной организацией хроматина. Цистоциты из 1-го и 2-го регионов гермария содержат по одному сферическому ядрышку, занимающему немного смешенную от центра ядра позицию. После перемещения цисты в регион 3 гермария и с началом эндоредупликации хроматина в ядрах питающих клеток плотный фибрillарный компонент ядрышка распределяется над областью, содержащей рДНК, в виде сложной, многолопастной структуры. В ядрах с политетными хромосомами ядрышко продолжает занимать позицию в центре ядра, вытесняя хромосомы на периферию ядра. С началом конденсации хроматид хромосомы становятся округлыми и рыхлыми, а материал ядрышка оказывается вытесненным в межхромосомные области. Распад политетных хромосом на эндохромосомы сопровождается распределением ядрышкового материала по всему объему ядра в виде скоплений разных размера и формы. В ядрах с ретикулярной структурой хроматина можно выделить три варианта пространственной организации ядрышкового аппарата: 1) многочисленные ядрышки сферической формы, распределенные по всему объему ядра (на поздних стадиях оогенеза наиболее крупные ядрышки находятся на периферии ядра); 2) ядрышки образуют разветвленную сеть в виде взаимосвязанных канальцев; 3) сеть значительно дезинтегрирована, границы канальцев «смяты». В первых двух случаях рДНК и фибрillарин находятся на периферии ядрышек, образуя многочисленные гранулы.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Программы повышения конкурентоспособности ТГУ (проект № 8.1.39.2017).

ВЛИЯНИЕ ГЕНОМНЫХ ДУПЛИКАЦИЙ НА АКТИВНОСТЬ ТРАНСКРИПТОМА КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ. © О. В. Анацкая,<sup>1</sup> Н. Н. Никольский, А. Е. Виноградов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,  
<sup>1</sup> olga.anatskaya@gmail.com

Полиплоидизация соматических клеток широко распространена в тканях млекопитающих. У человека полиплоидия особенно сильно развивается в коре головного мозга, амигдале, мозжечке, а также в сердце, печени, трофобласте и эпителии. В то же время ее влияние на биологические процессы и экспрессию генов до сих пор неясно. Это неудивительно, потому что, сохраняя баланс дозы генов, полиплоидия может оказывать лишь слабое влияние на работу отдельных генов. Однако модифицируя активность тысяч генов одновременно, полиплоидия участвует в координации процессов постнатального развития, онтогенетического программирования, дифференцировки и патогенеза многих заболеваний, включая сердечно-сосудистые и онкологические (Anatskaya O. V. et al. 2010. Int. J. Cardiol. 141 : 81; Erenpreisa J., Cragg M. S. 2013, Cancer Cell Int. 13 : 92; Vazquez-Martin A. et al. Oncotarget. 7 : 75235). Для того чтобы улучшить понимание роли полиплоидии в регуляции активности транскриптома, мы исследовали эффекты полиплоидии на активность генных модулей развития, эмбриогенеза, стволовости, морфогенеза и дифференцировки методом межвидового сравнения транскриптомов. Основой метода является попарно перекрестное сравнение транскриптомов в тканях с разной полиплоидизацией. В нашем случае это сердце человека—сердце мыши и печень мыши—печень человека. Источником данных служила база BioGPS (Wu C. et al. 2016. Nucleic Acids Res. 44 : D313). Сравнение выявило 672 гена с повышенным и 831 ген с пониженным уровнем мРНК в полиплоидных тканях по сравнению с диплоидными тканями при 1.5-кратном пороге различий. Из общего списка GO-биологических процессов, достоверно обогащенных регулируемыми пloidностью генами, 92 процессы содержали в названии термины «development», «embryo», «morphogenesis», «differentiation» и «stem cell» и потому представляли особый интерес. Из 92 процессов 82 относились к развитию и дифференцировке, а 10 — к пролиферации и поддержанию стволовой клетки («stem cell proliferation», «stem cell maintenance», «stem cell division») и «stem cell proliferation». Показано, что активированные пloidностью гены преимущественно обогащают GO-процессы, координирующие развитие и морфогенез, а также пролиферацию и поддержание стволовых клеток. Подавленные пloidностью гены обогащают преимущественно GO-процессы, координирующие дифференцировку, подтверждая каузальность связи между полиплоидией и индукцией фетальных и морфогенетических программ. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что полиплоидия не является следствием терминальной дифференцировки и старения. Более того, они хорошо согласуются с данными об активации полиплоидией программ стволовости, полученными ранее на гигантских трансформированных клетках (Erenpreisa J., Cragg M. S. 2013. Cancer Cell Int. 13 : 92). В связи с этим представленные сведения помогут улучшить понимание роли полиплоидии в нормальной физиологии, трансформации и других патологических состояниях.

КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МОРФОГЕНЕЗА КРЕМНЕЗЕМНОЙ СТВОРКИ ДИАТОМОВЫХ ВОДОРОСЛЕЙ. © Е. Д. Бедошивили,<sup>1</sup> К. В. Гнеушева, М. С. Попова, Е. В. Лихошвай. Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, <sup>1</sup>bedoshvili@list.ru

Многие организмы способны производить кремнеземные структуры, но диатомовые водоросли способны создавать наибольшее разнообразие микро- и нано-размерных форм. Строение панцирей диатомей видоспецифично. Элементы кремнеземного панциря синтезируются внутри клетки в специализированных органеллах — везикулах отложения кремнезема, окруженных особой мембранный силикалеммой. Симметрия створки диатомей (радиальная или билатеральная) определяется на самой ранней стадии морфогенеза и контролируется цитоскелетом. Показано, что ингибиторы работы микротрубочек и актиновых микрофиламентов вызывают различные аномалии в строении створок — изменения формы створки и расположения на ней выростов и крупных структур (швов, осевых полей), а также упорядоченность расположения ареол (отверстий в створке). Исследования влияния различных ингибиторов работы цитоскелета на створки в синхронизированных культурах диатомей позволили более точно определить роль микротрубочек в формировании створки на определенных стадиях ее морфогенеза. После обработки синхронизированной культуры *Synedra acus* subsp. *radians* ингибитором микротрубочек колхицином в период формирования отверстий ареол образуется большое количество створок без ареол на значительной площасти створки. С другой стороны, обработка клеток паклитакселом вызывает образование аномальных ареол с видоизмененным велумом и иногда даже крупных отверстий на панцире. Скорее всего, значение актина и микротрубочек не ограничено их участием в везикулярном транспорте, они выполняют еще и роль опоры, а также контролируют начало развития створки после цитокинеза. Известно, что развитие створки начинается сразу после цитокинеза. При этом показано, что при каких-либо нарушениях цитокинеза или деления ядра (например, после обработки клеток колхицином и цитохалазином D) морфогенез створки все равно происходит, но при этом формируется только одна цилиндрическая створка. Несмотря на прошедшие полвека исследований процесса морфогенеза диатомей, остается дискуссионным вопрос о происхождении везикулы отложения кремнезема. Обращает на себя внимание онтогенетическая близость плазмалеммы и силикалеммы — часть силикалеммы становится плазмалеммой в процессе освобождения зрелой створки из клетки. Силикалемма и плазмалемма сливаются в районе загиба сформированных дочерних створок, при этом остатки верхней части силикалеммы и старой плазмалеммы оказываются в пространстве между двумя дочерними клетками. Принимая во внимание такую тесную структурную связь плазмалеммы и силикалеммы, а также подвижность плазмалеммы на завершающих стадиях морфогенеза, мы предполагаем, что возможен и обратный процесс — инвагинация плазмалеммы и формирование первоначальной везикулы SDV. Такая везикула может оставаться «на причале» возле плазмалеммы и расстинуть за счет сливающихся с ней везикул, что наблюдается во многих исследованиях морфогенеза створки.

Таким образом, к настоящему времени накоплены данные, свидетельствующие об участии определенных клеточных механизмов в контроле процесса морфогенеза

диатомей. Изменения в работе этих клеточных механизмов приводят к формированию разнообразных кремнеземных структур в экспериментах, а в процессе эволюции может обеспечивать многообразие форм диатомей.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФАНО (проект 0345-2015-0031 «Клеточные и молекулярные механизмы морфогенеза диатомей»).

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ЯДРЫШКОВОГО ОРГАНИЗАТОРА В РАСТУЩИХ ООЦИТАХ КРАСНОУХОЙ ЧЕРЕПАХИ.** © А. В. Беляев, Е. И. Кошель, А. Г. Дёмин, А. Г. Да-видьян, С. А. Галкина, А. Ф. Сайфитдинова, Е. Р. Гагинская, С.-Петербургский государственный университет, t800vst1000@mail.ru

Снабжение клетки рибосомными РНК обусловлено экспрессией ядрышкообразующих районов (ЯОР) хромосом и функционированием ядрышка. В растущем ооците накапливаются огромные количества рРНК для обеспечения ранних этапов эмбриогенеза до начала экспрессии генов в зародыше. В зависимости от источника рРНК в ооците животных обнаруживается большое разнообразие сценариев функционирования ЯОР. Класс Рептилии в этом отношении представляет особый интерес в силу существенных различий между представителями разных отрядов в механизмах накопления рРНК в ооцитах. В частности, у черепах и крокодилов в ядрах крупных ооцитов на морфологическом уровне описаны экстрахромосомные ядрышки. Тем не менее механизм их образования до сих пор остается невыясненным. В настоящей работе нами впервые были проанализированы некоторые молекулярно-генетические аспекты амплификации ЯОР у рептилий на примере красноухой черепахи *Trachemys scripta*.

На основе анализа неаннотированных контигов из геномной сборки бугорчатой черепахи *Malaclemys terrapin* GCA\_001728815.2, депонированной в NCBI, была реконструирована и описана нуклеотидная последовательность кластера генов рРНК и межгенного спейсера IGS. Полученная последовательность полного рибосомного повтора была использована как референс для сборки транскрибуемой части рибосомного повтора красноухой черепахи. Сборка проводилась с использованием базы «сырых» последовательностей транскриптома (NCBI, SRA: SRX565330). Используя полученную информацию, мы разработали ДНК-зонд для внешнего транскрибуируемого спейсера 5'ETS рибосомного повтора. FISH проводили на криосрезах яичников половозрелых самок красноухой черепахи. Целью экспериментов было выявление рДНК и несплайсированной пре-рРНК.

В результате выполнения работы нами впервые была реконструирована полная последовательность рибосомного повтора: кластер рДНК и межгенный спейсер IGS. Используя 5'ETS-зонд, мы выявили рДНК в ядрышках и подтвердили ее транскрипционную активность. Полученные результаты демонстрируют сходство в структуре и функционировании ядрышек у рептилий с экстрахромосомными ядрышками амфибий. Несмотря на эволюционную близость Черепах к классу Птицы, сценарии функционирования ЯОР в оогенезе этих животных имеют существенные различия. Полученные результаты, несомненно, вносят вклад в представления о разнообразии типов оогенеза.

Исследование реализовано при финансовой поддержке грантов СПбГУ (проект 1.50.1043.2014) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-04-05684), а также при использовании оборудования РЦ СПбГУ «Хромас».

**ХРОМАТИНРЕМОДЕЛИРУЮЩИЙ БЕЛОК ATRX ПРИСУТСТВУЕТ В ЭКСТРАХРОМОСОМНЫХ СТРУКТУРАХ ЯДРА ООЦИТОВ НАСЕКОМЫХ.** © Д. С. Боголюбов,<sup>1</sup> И. С. Степанова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, <sup>1</sup>dbogol@mail.ru

Исследовано распределение хроматинремоделирующего белка ATRX в ядрах ооцитов трех видов лабораторных насекомых в связи с развитием кариосферы разных типов. Кариосфера — специфическая для мейоза структура, образованная конденсированными бивалентами, собранными в ограниченном объеме крупного ядра ооцита. Она формируется на стадии диплотены у организмов, у которых в оогенезе имеет место физиологически детерминированная транскрипционная инактивация ядра ооцита. Белок ATRX ( $\alpha$ -thalassemia mental retardation X-linked) представляет АТФ-зависимую ДНК-геликазу и является одним из основных хроматинремоделирующих белков, связанных с гетерохроматинизацией. Однако локализация ATRX в ядре ооцитов и его участие в преобразованиях хроматина до сих пор были показаны лишь в отношении млекопитающих в ходе формирования их специфической кариосферы (De La Fuente et al., 2012. Results Probl. Cell Differ. 55 : 45—68). С помощью иммунофлуоресцентной и иммуноэлектронной микроскопии мы изучили локализацию ATRX в диплотенных ооцитах, отличающихся морфологическим строением ядра, на примере насекомых *Acheta domesticus* (кариосфера в оогенезе не формируется), *Tribolium castaneum* (кариосфера имеет внешнюю экстрахромосомную капсулу) и *Tenebrio molitor* (формируется лишенная капсулы кариосфера, или кариосома). Во всех случаях формирования кариосферы (кариосомы) зоны локализации ATRX, как ожидалось, связаны с гетерохроматином, что наводит на мысль об эволюционной консервативности ATRX в процессе формирования кариосферы. Неожиданно оказалось, что ATRX локализуется и в экстрахромосомном материале определенных типов. Таковым, например, оказался «внутренний кластер интерхроматиновых гранул» в составе сложного ядерного тельца ооцитов *A. domesticus*, объединяющего морфологические компоненты телец Ка-хала или телец гистоновых локусов, с одной стороны, и кластеров интерхроматиновых гранул — с другой (Bogolyubov et al. BioEssays. 31 : 400—409). В ооцитах *T. molitor* антитела к ATRX маркировали определенную группу гетероморфных ядерных телец — как связанных с кариосферой, так и лежащих свободно в нуклеоплазме. В ооцитах *T. castaneum* особый интерес представляет локализация ATRX в капсule кариосферы — специфическом ядерном компартменте, который, по-видимому, служит не только «изолятором» продуктов хромосомной активности от остальной части нуклеоплазмы, но, не исключено, может быть более тесно вовлечен в процессы экспрессии генов (Bogolyubov et al., 2013. Cell Biol. Int. 37 : 1061—1079). Выявление ATRX в экстрахромосомном компартменте ядра ооцитов — капсule кариосферы и (или) ядерных тельца — свидетельствует в пользу гипотезы о запасающей функции данных структур. Вместе

с тем ядерное распределение ATRX, очевидно, весьма динамично, поскольку этот белок иммуноцитохимически может не выявляться в морфологически сходных образованиях, присутствующих в одном ядре. Полученные данные еще раз свидетельствуют в пользу высокой сложности ядерных структур ооцитов и необходимости использования «нестандартных» модельных объектов для лучшего понимания структуры и функций клеточного ядра.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-04-01857).

**ЛАТРУНКУЛИН В ВЫЗЫВАЕТ ИЗМЕНЕНИЕ ХАРАКТЕРА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ МОНОМЕРНОГО И ФИБРИЛЛЯРНОГО АКТИНА В ПРОНУКЛЕУСАХ ЗИГОТ МЫШИ. © Н. А. Боголюбова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, nataly\_bogoly@mail.ru**

Взаимосвязь между состоянием актинового цитоскелета и динамикой актина в клеточном ядре в последнее время привлекает внимание исследователей, связанных с изучением биологии ядерного актина. В данной работе было прослежено влияние ингибирования полимеризации актина в цитоплазме латрункулином B (LatB) на характер локализации актина в пронуклеусах зигот мыши. Пронуклеусы являются функционально и морфологически атипичными ядерными структурами, в которые после оплодотворения преобразуются материнский и отцовский наборы хромосом.

Зиготы, находившиеся на середине одноклеточной стадии развития, инкубировали *in vitro* в среде, содержащей 10 мкг/мл LatB, в течение 30, 60 и 180 мин, после чего фиксировали. Далее мономерный (G) и фибрillлярный (F) актин визуализировали с помощью прямого мечения флуоресцентными маркерами Alexa Fluor 488-ДНКаза-I (488-DNase) и TRITC-фalloидин (TPh), после чего характер внутриядерного распределения данных форм актина анализировали с помощью конфокального микроскопа Leica TS5.

В родительских пронуклеусах контрольных зигот меченный G-актин был локализован в нуклеоплазме, где его свечение представляло собой совокупность многочисленных, равномерно распределенных точечных флуоресцентных сигналов. В местах расположения проядышек — функционально неактивных эмбриональных аналогов ядрышек — флуоресценция актина отсутствовала. После окрашивания зигот с помощью TPh специфического флуоресцентного сигнала от меченого фибрillлярного актина в местах расположения пронуклеусов обнаружено не было. После 30 мин инкубации в среде, содержащей LatB, и окрашивания 488-DNase у большинства зигот на фоне равномерного свечения G-актина в нуклеоплазме была отчетливо видна более яркая флуоресценция проядышек. Характер локализации флуоресцентной метки в местах расположения пронуклеусов после окрашивания зигот TPh не отличался от наблюдавшегося ранее у контрольных зародышей. У зигот, инкубированных в присутствии LatB в течение 60 мин, характер распределения G-актина был схожен с наблюдавшимся у контрольных зародышей. После окрашивания зигот TPh наблюдали два варианта мечения пронуклеусов: либо равномерно распределенные точечные флуоресцентные сигналы по

всей площади оптического среза ядра, включая места локализации проядышек, либо более яркое свечение проядышек на фоне флуоресценции нуклеоплазмы. После инкубации зигот с LatB в течение 180 мин свечение меченого флуоресцентными красителями мономерного и фибрillлярного актина в зоне расположения пронуклеусов по визуальной оценке было значительно слабее, чем в предыдущем случае. Однако в тех пронуклеусах, где было возможно определить места расположения проядышек, внутриядерная локализация обеих форм актина соответствовала ранее наблюдавшейся у зигот после инкубации с LatB в течение 60 мин.

Полученные данные позволяют говорить о том, что повышение уровня G-актина в цитоплазме, вызванное кратковременным действием LatB, индуцирует в пронуклеусах зигот перераспределение мономерного актина и появление выявляемого фаллоидином актина, нетипично для этих ядерных структур в физиологических условиях. Длительная инкубация зигот с LatB, возможно, приводит к уменьшению импорта актина в пронуклеусы.

Работа выполнена в рамках государственного задания Института цитологии РАН (гос. регистрация № 01201351105).

**ВЗАЙМОДЕЙСТВИЕ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ С КЛЕТКАМИ ЭУКАРИОТ В КУЛЬТУРЕ. © Е. С. Божокина, И. А. Гамалей, Т. Н. Ефремова, А. П. Ивлев, Л. В. Кевер, Я. Ю. Комиссарчик, С. Ю. Хайтилина,<sup>1</sup> О. А. Цаплина. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, <sup>1</sup>skhspb@gmail.com**

Проникновение бактерий в клетки эукариот (инфекция) — это уникальный процесс, в котором взаимодействие бактериальных и клеточных факторов приводит к захвату бактерий эукариотическими клетками, в норме не являющимися фагоцитами. Патогенные бактерии проникают в клетку-хозяина, либо встраивая пору в цитоплазматическую мембрану и инъецируя собственные эффекторы непосредственно в цитоплазму («триггерный» механизм), либо с помощью специфических поверхностных белков, которые взаимодействуют с рецепторами клетки-хозяина (механизм «застежки-молнии»). Оба пути связаны с активацией сигнальных каскадов, реорганизацией цитоскелета и полимеризацией актина (Sansonetti, 2001; Pizarro-Cerda et al., 2016). Способностью проникать в клетки эукариот обладают не только патогенные, но и условно-патогенные бактерии, однако механизмы их патогенности очень мало изучены. Инвазию условно-патогенных бактерий обычно связывают с активностью токсинов (Hertle, 2005) или секрецируемых бактериями протеаз (Ishii et al., 2014). Однако мы обнаружили, что условно-патогенные бактерии *Serratia grimesii* и *S. proteamaculans*, продукты внутриклеточной актин-специфической металлопротеазы ECP32/гримелизин и протеализин способны проникать в культивируемые клетки эукариот и вызывать реорганизацию их цитоскелета. Трансформация *E. coli* плазмидной ДНК, несущей ген гринелизина или протеализина, приводит к появлению в бактериях инвазивного фенотипа, что указывает на активное участие фермента в процессе инвазии. Наряду с протеализином инвазивная активность *S. proteamaculans* определяется гемолитическим токсином ShlA и внеклеточной протеазой серральзин, активность которых в

*S. grimesii* низка. Это коррелирует с более высокой инвазивной активностью *S. proteamaculans* по сравнению с инвазивной активностью *S. grimesii*, указывая на то, что секреция токсина и серрализина усиливает инвазивную активность серраций, но не является критически необходимой для инвазии. Бактерии рода *Serratia* проникают как в трансформированные клетки, так и в иммортализованные фибробласты, хотя и с меньшей эффективностью. Чувствительность этих клеток к бактериальной инвазии значительно возрастает после инкубации клеток с антиоксидантами N-ацетилцистеином и дигидролипоевой кислотой. По данным электронной микроскопии, преимущественным механизмом проникновения серраций в эукариотические клетки, по-видимому, является механизм «застежка-молния», на первом этапе которого происходит взаимодействие бактериального инвазина с поверхностным рецептором клетки-хозяина. Среди поверхностных белков бактерий особый интерес представляет белок OmpX, аналог поверхностного белка сальмонелл Rck, который является медиатором триггер-независимой инвазии сальмонелл в культивируемые эукариотические клетки (Rosselin et al., 2010). Анализ структуры этого белка (Lackey, 2014) и наши предварительные результаты указывают на то, что OmpX может быть субстратом протеализина. Известно, что в механизме «застежка-молния» инвазин взаимодействует с поверхностным рецептором E-кадгерином (Pizarro-Cerda et al., 2016). Увеличение чувствительности клеток к инвазии бактериями *S. grimesii* после инкубации клеток с N-ацетилцистеином приводит к увеличению экспрессии генов E-кадгера и увеличению количества E-кадгера в клеточных экстрактах. Сопоставление этих результатов с данными электронной микроскопии позволяет предположить, что E-кадгерин участвует в проникновении *S. grimesii* в клетки эукариот. Это предположение подтверждается данными иммунофлуоресцентного анализа о колокализации бактерий *S. grimesii* с E-кадгерином клетки-хозяина.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОГО СТАРЕНИЯ В ПОПУЛЯЦИИ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА. © А. В. Бородкина,<sup>1</sup> П. И. Дерябин, А. А. Грюкова, А. Н. Шатрова, Е. Б. Бурова, Н. Н. Никольский. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, <sup>1</sup>borodkina618@gmail.com

Ранее мы показали, что в условиях сублетального окислительного стресса (1 ч, 200 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) эндометриальные стволовые клетки человека (эМСК) входят в состояние преждевременного старения. Были выявлены основные маркеры, характерные для старых клеток, — гипертрофия, необратимая остановка пролиферации и накопление в популяции SA-β-Gal-положительных клеток. При исследовании молекулярного механизма преждевременного старения эМСК была установлена роль сигнальных путей ATM/Chk2/p53/p21/Rb и p38/МАРКАР-2 в реализации необратимого ареста клеточного цикла, а также продемонстрирован вклад mTORC1-сигналинга в модуляцию фенотипа эМСК.

Целью настоящей работы явилось исследование механизмов распространения преждевременного старения в популяции эМСК. Известно, что стареющие клетки через ауто/паракринный механизм могут влиять на клетки микроокружения, секретируя множество различных факторов, включая цитокины, хемокины, протеазы и ростовые

факторы. Такой профиль секретируемых стареющими клетками молекул получил название ассоциированного со старением секреторного фенотипа (senescence associated secretory phenotype, SASP). На сегодняшний день известно, что компоненты SASP опосредуют иммунный клиренс стареющих клеток, кроме того, они могут стимулировать трансформацию соседних предраковых клеток и (или) инициировать паракринное старение соседних здоровых клеток. В настоящей работе мы исследовали влияние факторов, секретируемых стареющими эМСК на нативные клетки. В первую очередь была проанализирована возможность индукции старения нативных эМСК при их культивировании в кондиционной среде, полученной от старых (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-обработанных) клеток. Было показано, что культивирование нативных эМСК в кондиционной среде старых клеток приводит к заметному замедлению пролиферации, увеличению размера клеток, повышению уровня эндогенных активных форм кислорода, появлению окрашивания на SA-β-Gal, возникновению повреждений ДНК и усилию активности сигнального пути p53/p21/Rb, опосредующего блок клеточного цикла. Далее при помощи жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии высокого разрешения был проведен детальный сравнительный анализ состава секретомов контрольных и старых (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-обработанных) эМСК. В составе секретомов контрольных и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-обработанных эМСК суммарно было идентифицировано 892 белка. Среди выявленных белков 659 были общими, тогда как 141 и 92 белка оказались уникальными для секретомов контрольных и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-обработанных эМСК соответственно. Дальнейший анализ полученных данных позволил достоверно оценить различия в уровнях экспрессии и последующей секреции белков, общих для секретомов нативных и старых клеток. Показано, что окислительное воздействие приводило к увеличению секреции 167 белков и одновременному уменьшению секреции 114 белков. Результаты масс-спектрометрии были дополнительно верифицированы при помощи иммуноблотинга и иммуноферментного анализа. Также было установлено, что белки, секреция которых повышалась после действия H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, вовлечены в клеточную адгезию, интегринопосредованную адгезию и remodeling внеклеточного матрикса. Суммируя все полученные результаты, можно заключить, что факторы, секретируемые старыми клетками, опосредуют распространение паракринного старения в популяции нативных эМСК.

TARGETING THE TUMOR MICROENVIRONMENT FOR LUNG CANCER TREATMENT. © Anna Brichkina. Institute of Molecular Oncology, Center for Tumor- and Immunobiology, Philipps University, Marburg, Germany, brichkinaa@gmail.com

Lung cancer has been associated with the highest rate of cancer-related deaths worldwide. Although major advances have been made in understanding this disease, including the identification of novel potential therapeutic targets, overall survival has not significantly changed over the past several decades. It is becoming clear that the most effective approach for treating lung cancer requires therapies that target both tumor cells and the tumor microenvironment. In this respect, stromal fibroblasts could be attractive targets, because they are known to provide additional signals to support tumor growth, survival, and drug resistance. Unfortunately, no treat-

ment option exists that successfully targets this component of the tumor microenvironment. In order to develop the strategies for efficient lung cancer treatment based on the targeting tumor stroma, we used mouse models of lung cancer, primary human lung cancer material and bioinformatic analysis of human lung cancer stromal interactomes. We demonstrate that p38MAPK as a key component in the tissue microenvironment to regulate both — activation of tumor-associated macrophages and stromal fibroblasts. We identify fibroblast-specific hyaluronan synthesis at the center of p38-driven tumorigenesis, which regulates early stromal fibroblast activation, the conversion to Carcinoma-Associated Fibroblasts (CAF), and cancer cell proliferation. We propose that targeting p38MAPK pathway could provide an important improvement for lung cancer treatment.

**ЭКСПРЕССИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ ОСТ4 И ЕГО ПСЕВДОГЕНОВ В КЛЕТКАХ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ТОЛСТОЙ КИШКИ ЧЕЛОВЕКА.** © М. А. Быстрыкова,<sup>1</sup> С. А. Кошкин,<sup>2</sup> Е. Н. Толкунова,<sup>2</sup> С.-Петербургский государственный университет и <sup>2</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ima-9811329780@mail.ru

Важным транскрипционным фактором плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека является Oct4. Он также экспрессируется в опухолевых стволовых клетках (ОСК) и является их биомаркером. Существует предположение о том, что уровень экспрессии Oct4 в значительной степени связан с развитием и прогнозом колоректального рака. В связи с наличием нескольких вариантов транскриптов и изоформ белка, а также экспрессии псевдогенов нужен более строгий анализ Oct4 во избежание ложных выводов. Известны три транскрипта Oct4 — Oct4A, Oct4B и Oct4B1. Oct4A локализуется в ядре ЭСК и ОСК, где поддерживает плюрипотентность клеток и их способность к самообновлению. Oct4B экспрессируется в цитоплазме ОСК, не поддерживает их плюрипотентность. Oct4B1 является формой Oct4B, полученной путем альтернативного спlicingа. Изначально он был найден в ядре и цитоплазме плюрипотентных и недифференцированных клеток. Есть сведения о том, что он действует как антиапоптотический фактор в опухолях мочевого пузыря, желудка и толстой кишки. Исследования выявляют в большинстве клеток экспрессию псевдогенов Oct4pg1, Oct4pg3 и Oct4pg4. Существует взаимосвязь между экспрессией Oct4A и экспрессией псевдогенов в ЭСК — во время индуцированной дифференцировки происходит постепенное уменьшение Oct4A параллельно с увеличением экспрессии псевдогенов. Существует ли такая связь между OCT4 и его псевдогенами в клетках колоректального рака человека, пока неизвестно.

Исследования экспрессии гена Oct4 мыши показали, что он не обнаруживается во взрослых стволовых клетках ряда соматических тканей, в том числе эпителия кишечника, клетках костного мозга (гемопоэтических и мезенхимных линий), волосяного фолликула, головного мозга и печени, при этом у мышей не выявлено нарушения гомеостаза или регенеративных способностей, что дает основания предположить, что экспрессия Oct4 является необязательной для самообновления и регенерации соматических стволовых клеток взрослых млекопитающих.

Идентификации Oct4 в соматических тканях и линиях клеток рака могут быть результатом обнаружения

транскриптов псевдогенов с помощью ОТ-ПЦР и (или) ядерного обнаружения псевдогенных белков иммуноцитохимией. Объективно существует сложность выявления различий между Oct4-изоформами. Все белковые изоформы Oct4 идентичны в их С-концевой области и различаются N-концевой областью, так что расположение epitопов, распознаваемых анти-Oct4-антителами, следует учитывать в первую очередь в сочетании с тщательным анализом транскриптов Oct4. Учитывать надо также вероятность того, что Oct4-псевдогены транслируются в белки и что Oct4-pg1 может локализоваться в ядре.

Цель: исследовать экспрессию различных форм Oct4 в операционном материале пациентов с adenокарциномой толстой кишки и оценить их соотношение. Для исследования форм Oct4 использовали 14 образов опухолей и нормальную ткань эпителия толстой кишки. Из образцов выделяли РНК, синтезировали кДНК и на основе ОТ-ПЦР характеризовали образцы по экспрессии форм стволового маркера Oct4.

Доклад содержит графические материалы, полный перечень и анализ полученных данных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской научного фонда (проект 14-50-00068 «Молекулярно-клеточные технологии для лечения социально значимых заболеваний»).

**МЕТИЛТРАНСФЕРАЗА ЕНМТ2/G9a АКТИВИРУЕТ p53 ПО МЕТИЛНЕЗАВИСИМОМУ МЕХАНИЗМУ.** © Е. Васильева, Л. Лезина, А. В. Антонов, Н. А. Барлев. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

p53 является одним из важнейших супрессоров опухолей в организме человека. Он функционирует в основном как транскрипционный фактор, и его активность регулируется множеством посттрансляционных модификаций. Среди различных ковалентных модификаций, обнаруженных у p53, наиболее спорным является метилирование лизина. Мы обнаружили, что G9a (hG9a) человека в отличие от мышьного ортолога (mG9a) стимулирует транскрипционную активность p53. Экзогенный и эндогенный hG9a увеличивают p53-зависимую транскрипцию таких проапоптотических генов, как Bax и Puma, что приводит к усилению апоптоза и сниженному формированию колонии. Важно отметить, что shRNA-опосредованый нокдаун hG9a ослабляет p53- зависимую активацию гена Puma. На молекулярном уровне hG9a взаимодействует с ацетилтрансферазой гистонов, p300 / CBP, что приводит к увеличению ацетилирования гистонов в промоторе Puma. Биоинформационные данные помогли нам обосновать наши выводы, продемонстрировав, что положительная корреляция между экспрессией G9a и p53 связана с лучшей выживаемостью больных раком легкого. В совокупности это исследование показывает, что в зависимости от клеточного и организменного контекстов ортологичные белки могут оказывать как пересекающиеся, так и противоположные функции. Кроме того, этот вывод имеет важные последствия в отношении использования ингибиторов G9a в сочетании с генотоксическими лекарствами для лечения p53-положительных опухолей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской научного фонда (проект 14-15-00816).

**РОЛЬ ATM-КИНАЗЫ В ПОДДЕРЖАНИИ СТРУКТУРЫ ХРОМАТИНА.** © А. К. Величко,<sup>1</sup> \* Н. В. Петрова,<sup>1</sup> А. В. Лужин,<sup>1</sup> С. В. Разин,<sup>1, 2</sup> О. Л. Кантидзе.<sup>1</sup> Институт биологии гена РАН, Москва, и<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, <sup>1</sup>velichko-ak@gmail.com

ATM (Ataxia Telangiectasia mutated) является се-рин/треониновой протеинкиназой и относится к семейству киназ, родственных фосфатидилинозитол-3-киназе (phosphatidylinositol 3-kinase related kinases, PIKK). ATM является одним из основных белков, координирующих клеточный ответ на повреждения ДНК. Каноническим индуктором ATM при двухцепочечных разрывах ДНК считается MRN-комплекс (Mre11-Rad50-Nbs1), который обеспечивает первоначальную локализацию ATM на сайте повреждения и последующее ATM-зависимое фосфорилирование многочисленных субстратов, включая фосфорилирование гистона H2AX по серину 139. На примере культур клеток человека мы продемонстрировали, что в условии острого гипоосмотического стресса происходят активация ATM-киназы и фосфорилирование ею многих мишней, включая массивное фосфорилирование гистона H2AX. Интересно, что подобная активация ATM не была связана с повреждением ДНК и не зависела от MRN. Кроме того, мы продемонстрировали, что клетки с пониженным уровнем экспрессии именно ATM, но не H2AX являются более чувствительными к острому гипоосмотическому стрессу. Наши предварительные данные свидетельствуют о том, что подобный эффект связан с активацией ATM-зависимого процесса ремоделинга хроматина, благодаря которому происходит восстановление и стабилизация его структуры после глобальной гипоосмотической декомпактизации. Результаты нашей работы указывают на значительно более широкую роль ATM не только в качестве сенсора повреждений ДНК, но и как активатора процессов восстановления нативной структуры хроматина в условии ее реорганизации.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российской научного фонда (проект 14-24-00022).

**ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ В ПАЦИЕНТ-СПЕЦИФИЧНЫХ МОДЕЛЯХ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА.** © В. А. Вигонт, А. Ю. Скопин, Е. В. Казначеева. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, vvigand@gmail.com

Болезнь Хантингтона (БХ) — это тяжелое наследственное нейродегенеративное заболевание, характеризующееся моторной дисфункцией, снижением когнитивных способностей и наличием психических расстройств. На молекулярном уровне БХ обусловлена мутацией в первом экзоне гена, кодирующем белок хантингтин. В результате данной мутации происходит увеличение полиглутаминового тракта в N-концевой области хантингтина и развивается тяжелая нейродегенеративная патология.

Значительное внимание в современном мире уделяется созданию адекватных моделей заболеваний, среди которых особо можно выделить использование технологий генетического репрограммирования соматических клеток, полученных от пациентов с конкретными молекулярными формами изучаемой патологии, с последующей на-

правленной дифференцировкой в определенный тип клеток. Подобный подход позволит создать платформу для изучения молекулярных механизмов, лежащих в основе нейродегенеративных заболеваний, а также для обеспечения направленного поиска потенциальных молекул-мишней и тестирования перспективных таргетных препаратов.

В последнее время накапливается все больше экспериментальных данных, демонстрирующих центральную роль нарушений кальциевой сигнализации в патогенезе нейродегенеративных заболеваний, и в частности БХ. Одним из наиболее общих типов притока кальция в клетку является депоуправляемый кальциевый вход (SOCE), характерный как для электроневозбудимых клеток, так и для нейронов.

В данной работе мы изучили патологические изменения SOCE в Хантингтон-специфичных нейронах человека, полученных путем генетического репрограммирования пациент-специфичных фибробластов в индуцированные плорипотентные стволовые клетки и их последующей дифференцировки в ГАМКергические нейроны стриатума.

Результаты показали, что SOCE в любой из линий Хантингтон-специфичных нейронов человека примерно в 2 раза выше, чем в любой из линий контрольных нейронов, полученных от здоровых людей. Таким образом, мы продемонстрировали хорошую воспроизводимость исследуемой модели болезни Хантингтона, что придает ей значительную ценность как для фундаментальных исследований, так и при использовании в качестве платформы для скрининга лекарств.

Необходимо отметить, что в данном исследовании использовали клетки, эндогенно экспрессирующие мутантный хантингтин с небольшой длиной полиглутаминового тракта (42—47 остатков глутамина), что, как правило, не приводило к выраженным нарушениям в других моделях. Однако эффект увеличения SOCE оказался столь же сильным, как и в ранее исследованных клеточных моделях, экзогенно экспрессирующих мутантный хантингтин со 138 остатками глутамина в тракте.

Далее с использованием молекулярно-генетических подходов было доказано, что наблюдаемые эффекты патологического увеличения SOCE связаны именно с экспрессией мутантного хантингтина. Мы показали, что алль-специфичный нокдаун мутантного хантингтина в больных клетках приводит к снижению SOCE до нормальных значений, в то время как лентивирусопосредованная экспрессия фрагмента мутантного хантингтина в здоровых клетках, напротив, увеличивает SOCE до патологических значений. Так же было продемонстрировано, что являющееся перспективной фармакологической субстанцией соединение EVP4593 способно снижать SOCE как в Хантингтон-специфичных, так и в контрольных нейронах.

В целом результаты свидетельствуют о том, что SOCE, вероятно, является одним из центральных механизмов, лежащих в основе нейродегенерации, и может считаться перспективной мишенью для разработки терапевтических подходов к лечению болезни Хантингтона.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской научного фонда (проект 17-74-20068) и стипендии президента РФ.

РАСТИТЕЛЬНЫЕ ГОРМОНЫ ПОВЫШАЮТ УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ СО СТРЕССОМ ЭПР. © М. С. Вильданова, Г. Е. Онищенко, Е. А. Смирнова. Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, vch4104@mail.ru

Растительные гормоны — низкомолекулярные регуляторы роста и дифференцировки растений. Абсцизовая (АБК) и гиббереллиновая ( $\text{ГК}_3$ ) кислоты являются условными антагонистами: АБК отвечает за переход растений в состояние покоя в ответ на абиотический и биотический стрессы (Lee, Luan, 2012), а  $\text{ГК}_3$  является стимулятором роста растений и также может быть вовлечена в реакции на абиотический стресс (Colebrook et al., 2014). Известно, что некоторые фитогормоны при определенных концентрациях оказывают разного рода воздействия на клетки животных (Li et al., 2011; Cesari et al., 2014).

Ранее нами было показано, что компоненты синтетической и секреторной систем культивируемых нормальных (кератиноциты HaCaT) и опухолевых (эпидермоидная карцинома A431) клеток кожи человека являются мишенью для действия АБК и  $\text{ГК}_3$  в субтоксической концентрации (Вильданова и др., 2014). Однако морфологически сходный ответ клеток на действие агентов, выражющийся в гипертрофии ЭПР и комплекса Гольджи, имеет разную функциональную основу. В частности, в опухолевых клетках АБК и  $\text{ГК}_3$  повышают уровень белка инволюрина, являющегося маркером дифференцировки кератиноцитов. Изменение состояния везикул кислого компартмента на ультраструктурном уровне, связанное с формированием аутофагосом и аутофагических вакуолей, наблюдается в нормальных кератиноцитах при действии АБК и в опухолевых при действии АБК и  $\text{ГК}_3$ .

Дифференцировка кератиноцитов — комплексный процесс, в ходе которого могут быть задействованы пути, связанные с секрецией, стрессом ЭПР и (или) аппарата Гольджи, UPR (unfolded protein response, универсальная реакция, направленная на восстановление эукариотических клеток после стресса ЭПР), аутофагией.

В ходе данной работы с помощью ПЦР в реальном времени мы продемонстрировали, что в клетках HaCaT АБК и  $\text{ГК}_3$  повышают уровень экспрессии генов *chop*, *atf4* и *grp*, ассоциированных со стрессом ЭПР. Исследования последних лет демонстрируют связь между стрессом ЭПР и аутофагией (Eckhart et al., 2013; Garcia-Huerta et al., 2016). В связи с этим мы провели двойное окрашивание клеток HaCaT флуоресцентным маркером моноданзилкадаверином, выявляющим везикулы эндосомно-лизосомного компартмента, предположительно участвующие в аутофагических процессах, и антителами к белку LC3, который является маркером аутофагосом. Наши исследования показали, что после инкубации с АБК по сравнению с контролем увеличивается количество клеток с везикулами среднего размера, окрашенными как моноданзилкадаверином, так и антителами к LC3 и, вероятно, являющимися аутофагосомами. После обработки клеток  $\text{ГК}_3$  такого эффекта не наблюдается.

Мы полагаем, что в клетках HaCaT АБК и  $\text{ГК}_3$  вызывают стресс ЭПР, при этом АБК дополнительно активирует аутофагию. Полученные результаты также могут говорить о том, что данные растительные гормоны оказывают влияние на процесс дифференцировки нормальных кератиноцитов.

ВНУТРИЯДЕРНЫЕ СТРУКТУРЫ В РАСТУЩИХ ООЦИТАХ ЗЕБРОВОЙ АМАДИНЫ *TAENIOPYGIA GUTTATA*. © В. А. Володькина, А. Ф. Сайфитдинова, Е. И. Кошель, С. А. Галкина, Е. Р. Гагинская. С.-Петербургский государственный университет, leravolo94@gmail.com

Крупные ядра растущих ооцитов птиц, в которых происходит активная транскрипция, являются удобными объектами для изучения организации и закономерностей функционирования эукариотического генома. Детальные исследования организации ядер ооцитов ранее были выполнены для представителей отрядов Курообразных, Голубеобразных и Воробьиных. Показано, что с центромерными районами хромосом могут быть ассоциированы «белковые тела» разного размера, их маркерный компонент — белки когезинового комплекса. В ооцитах голубя сизого были описаны РНК-содержащие тельца, не связанные с хромосомами, — «плотные шары» и «полые сферы». Эти структуры представляют собой тельца, подобные тельцам Кахала. Вместе с тем ядра растущих ооцитов домашней курицы, японского перепела и зяблика не содержат никаких заметных экстрахромосомных телец. Присутствуют ли экстрахромосомные внутриядерные тельца в ядрах растущих ооцитов других представителей класса, неизвестно. В настоящей работе мы провели первичный анализ пространственной организации ядра растущего ооцита зебровой амадины с использованием лазерной конфокальной сканирующей микроскопии и иммуноцитохимии.

Зебровая амадина — представитель выюрковых ткачиков, важный модельный объект биологии. Мы показали, что в изолированных ядрах размером 50—100 мкм хромосомы находятся в фазе ламповых щеток (ЛЩ), активно транскрибируются и лежат обособленно от ядерной оболочки. С хромосомами могут быть ассоциированы довольно крупные тельца (диаметром около 5 мкм), содержащие коилин, FLASH, РНК и не являющиеся центромерными белковыми телами. С конденсированными районами хромосомы линии половых клеток (GRC) ассоциированы множественные маленькие (размером менее 0.5 мкм) сферические тельца, содержащие коилин. Похожие структуры небольшого размера, детектируемые теми же антителами R288, были зафиксированы в ядрах ооцитов лягушек *Pelophylax esculentus* как прилежащие к хромомерным валикам коилинсодержащие гранулы. По периферии ядра располагаются экстрахромосомные тельца, содержащие нуклеиновые кислоты и коилин. Размеры их от 0.5 до 3 мкм, но одно ядро приходится порядка 40 телец. В ядрах ооцитов меньшего диаметра отмечено присутствие телец такого же состава, но более крупных. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о большом разнообразии функциональной организации ядра ооцита у птиц даже в пределах одного отряда Воробьиные (ср.: Saifitdinova et al., 2003).

Работа выполнена при финансовой и технической поддержке Ресурсного центра «ЦКП ХРОМАС» Научного парка СПбГУ и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-04-05684а).

АКТИВНОСТЬ ММП И СИНТЕЗ КОМПОНЕНТОВ ВКМ В ПРОЦЕССЕ ХОНДРОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МЕЗЕНХИМИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В

РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ. © И. В. Воронкина,<sup>1</sup> И. И. Гин, Л. В. Смагина, Т. А. Крылова, А. С. Мусорина, Г. Г. Полянская. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, <sup>1</sup>voroniina@list.ru

Одним из направлений, исследующих функциональные особенности мезенхимных стволовых клеток (МСК) в процессах их дифференцировок, является выяснение роли матриксных металлопротеиназ (ММП), которые влияют на фундаментальные клеточные процессы, участвуют в процессах ремоделирования тканей и развития органов, специфически модулируя сигнальные пути посредством взаимодействия с субстратами разной природы и путем перестройки внеклеточного матрикса (ВКМ).

Ранее нами было показано наличие активности ММП-9, ММП-2 и ММП-1 в процессе дифференцировки в адипогенном и остеогенном направлениях в линиях МСК, выделенных из костного мозга (FetMSC), и зачатка конечности (M-FetMSC) одного донора — раннего эмбриона человека. Сравнительный анализ динамики активностей этих ММП в процессе обеих дифференцировок показал различия между монослойными культурами (2D) и полученными из них клеточными сфероидами (3D).

Настоящее исследование состояло из нескольких частей: 1) сравнительный анализ активности ММП-1, -2, -8, -9 и -13; 2) сравнительный анализ экспрессии маркеров хондрогенеза (коллаген 2 и агрекан) и некоторых компонентов ВКМ (декорин, версиан и коллаген I) в процессе хондрогенной дифференцировки клеток линии MSCWJ-1 в индукционной среде в течение 21 сут в условиях монослоя (2D) и в клеточных сфероидах (3D).

В работе использовали полученную в ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных» ИНЦ РАН (Санкт-Петербург, Россия) клеточную линию MSCWJ-1 (вновь полученная и охарактеризованная линия МСК, выделенная из Вартонова студня пупочного канатика человека). Направленную дифференцировку в хондрогенном направлении проводили в культуре микромасс. Сульфатированные гликозаминогликаны в процессе хондрогенной дифференцировки идентифицировали по окраске толуидиновым синим. Наличие и активность ММП определяли методом зигмографии, а присутствие и количество компонентов ВКМ — способом дот-блота и вестерн-блота проб кондиционированной среды культивирования и лизатов клеток.

При культивировании в индукционной хондрогенной среде культуры микромасс в течение 21 сут показан активный хондрогенез. Биохимический анализ показал, что в лизатах клеток накопление компонентов ВКМ идет лучше при условиях 3D, при этом в кондиционированной среде количество коллагена II, агрекана и декорина практически не изменяется. Активность ММП в среде снижается по мере дифференцировки, полностью исчезая к 21 суткам. Так как дифференцировочная среда не содержит сыворотки, все ММП синтезируются только клетками. Скорость снижения активности различна для разных ММП: например, для ММП-1 активность не фиксируется уже на 6-е сут, а для ММП-2 на 18-е сут она еще присутствует в среде.

По-видимому, в клеточных сфероидах (3D) имеет место более активный процесс хондрогенеза, чем в культуре микромасс (2D).

#### МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ РАЗВИТИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ИНСУЛИНУ В АДИПОЦИТАХ: РЕ-

АКТИВАЦИЯ РАПАМИЦИНОМ. © А. В. Воротников,<sup>1,3</sup> Н. В. Подкученко,<sup>1</sup> Ю. С. Стафеев,<sup>2,4</sup> М. Ю. Меньшиков.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Лаборатория клеточной подвижности, <sup>2</sup>Лабораторияangiогенеза Российского кардиологического научно-производственного комплекса Министерства здравоохранения РФ, Москва, <sup>3</sup>Медицинский центр Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова и <sup>4</sup>Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

Инсулинерезистентность (ИР) определяется как сниженная реакция клеток инсулинзависимых тканей (печени, мышц и жировой ткани) на физиологические концентрации инсулина. ИР является характерной чертой диабета 2-го типа и таких системных нарушений, как гипергликемия, гипертония и дислипидемия, в совокупности известных как метаболический синдром. Несмотря на большое многообразие генетических и физиологических факторов, приводящих к ИР, их общим звеном является снижение активности инсулинового каскада, связанное с нарушением сигнализирующей функции субстрата инсулинового рецептора — белка IRS. Этот механизм реализуется за счет фосфорилирования IRS по различным сериновым остаткам под действием ряда протеинкиназ, которые активируются в условиях воспаления, оксидативного стресса, гиперлипидемии и пищевой перегрузки. Многочисленные исследования указывают на ключевую роль в этом процессе первого белкового комплекса киназы mTOR (mTORC1) — мишени PI3-киназного каскада, активируемого IRS. При гиперактивации mTORC1 запускает петлю отрицательной обратной связи, приводящую к сериновому фосфорилированию IRS и подавлению тирозинового фосфорилирования IRS, необходимого для активации PI3-киназного каскада инсулином. В результате инсулин перестает адекватно стимулировать транспорт глюкозы в мышечные и жировые клетки и подавлять глюконеогенез в клетках печени.

Используя линейные адипоциты 3T3-L1 мыши как классическую модель, мы подтвердили наличие в этих клетках функционального инсулинового каскада (рецептор инсулина > IRS > PI3-киназа > Akt > AS160 > Глют4), который активирует выход глюкозного транспортера Глют4 на поверхность клетки и транспорт внешней глюкозы в адипоциты. Экспериментально моделируя состояния дислипидемии, воспаления, оксидативного стресса и стресса ЭПР, мы вызывали ИР и во всех случаях наблюдали снижение активности PI3-киназного каскада и Akt. Вместе с тем в условиях гиперлипидемии (основной фактор, провоцирующий ИР) мы обнаружили аберрантную активацию mTORC1 и повышенное фосфорилирование IRS по ключевому остатку Ser-307. Эти результаты согласуются с активацией механизма отрицательной обратной связи от mTORC1 и его мишени, рибосомальной киназы S6K1, к сериновому фосфорилированию IRS и снижению способности инсулина активировать свой каскад.

В поисках возможности выключения отрицательной обратной связи, реактивации инсулинового каскада и инсулинзависимого транспорта глюкозы в адипоциты мы использовали рапамицин — специфический ингибитор mTORC1. Как в нормальных условиях, так и в условиях экспериментальной гиперлипидемии рапамицин дозозависимо инактивировал mTORC1 и в концентрации 100 нМ полностью блокировал фосфорилирование субстрата mTORC1 — киназы S6K1 — в адипоцитах 3T3-L1. При этом рапамицин усиливал активацию инсулином

PI3-киназного каскада, киназы Akt и фосфорилирование главного регулятора транспортера глюкозы Глют4, белка AS160.

Таким образом, наши результаты демонстрируют аберрантную активацию mTORC1 в условиях экспериментальной гиперлипидемии в адипоцитах и важную роль mTORC1 в развитии жировой ИР. Рапамицин способен восстанавливать чувствительность инсулинового каскада к инсулину в условиях ИР и, таким образом, имеет терапевтический потенциал при гипергликемии и сахарном диабете 2-го типа.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-24-00086) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-04-02225а).

**ЭКЗОСОМАЛЬНЫЙ СЕКРЕТОРНЫЙ ПУТЬ УЧАСТВУЕТ В ТРАНСЛОКАЦИИ ДВУХ ИЗОФОРМ БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА 90 НА ПЛАЗМАТИЧЕСКУЮ МЕМБРАНУ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК.** © *M. A. Второва, A. B. Снигирева, O. C. Моренков, B. B. Врублевская. Институт биофизики клетки РАН, Пущино, v\_vrublevskaia@mail.ru*

Известно, что белок теплового шока 90 (Hsp90), ассоциированный с клеточной плазматической мембраной многих типов клеток, играет важную роль в обеспечении подвижности и инвазии нормальных и опухолевых клеток. В настоящее время механизмы транслокации Hsp90 на клеточную плазматическую мембрану не изучены. У Hsp90 отсутствуют сигнальный пептид и трансмембранный домен, которые обеспечивали бы его секрецию по классическому пути и фиксацию на плазматической мембране. Ранее с использованием проточной цитофлуориметрии и конфокальной микроскопии мы показали, что на плазматической мемbrane клеток фиброзаркомы (HT1080) и глиобластомы (A-172) человека экспрессируются две изоформы Hsp90 — Hsp90 $\alpha$  и Hsp90 $\beta$  — и что обе изоформы мембранны-ассоциированного Hsp90 участвуют в миграции и инвазии клеток. Целью данной работы было изучение механизмов транслокации Hsp90 $\alpha$  и Hsp90 $\beta$  на плазматическую мембрану клеток HT1080 и A-172. Механизмы транслокации Hsp90 на плазматическую мембрану исследовали с помощью ингибиторного анализа, оценивая влияние различных ингибиторов секреции белков на количество мембранны-ассоциированного Hsp90, которое определяется соотношением процесса транслокации на плазматическую мембрану новых Hsp90 из цитозоля и процессов удаления мембранны-ассоциированного Hsp90 с поверхности клеток посредством эндоцитоза и (или) диссоциации в межклеточное пространство.

На клеточных культурах HT1080 и A-172 показано, что обработка клеток ингибиторами классического ЭПР/Гольджи-зависимого пути секреции брефелдином А и монензином — ингибитором формирования липидных рафтов метил- $\beta$ -циклодекстрином — и ингибитором лизосомальной секреции хлоридом аммония не приводила к изменению уровня мембранны-ассоциированных Hsp90 $\alpha$  и Hsp90 $\beta$ . Обработка клеток двумя ингибиторами экзосомальной секреции GW4869 и диметил амилоридом в течение 2 ч снижала уровень двух изоформ мембранны-ассоциированного Hsp90 на 40—60 и 75—80 % соответ-

ственно, что свидетельствовало об участии экзосомального пути секреции в транслокации Hsp90 на поверхность клеточную мембрану. Для подтверждения данного вывода исследовали восстановление уровня мембранны-ассоциированного Hsp90 после обработки клеток гепарином. Ранее мы показали, что обработка клеток гепарином приводит к снижению уровня мембранный экспрессии Hsp90 $\alpha$  и Hsp90 $\beta$  на 40—80 %. Инкубация клеток, обработанных гепарином, при 37 °C в течение 1 ч сопровождалась полным восстановлением количества мембранны-ассоциированных Hsp90 $\alpha$  и Hsp90 $\beta$  на поверхности клеток. Брефелдин А, монензин, метил- $\beta$ -циклодекстрин и хлорид аммония не влияли на динамику восстановления уровня мембранны-ассоциированных Hsp90 $\alpha$  и Hsp90 $\beta$  после обработки клеток гепарином, в то время как GW4869 и диметил амилорид полностью ингибировали данный процесс.

В целом результаты, полученные на двух опухолевых клеточных культурах, свидетельствовали о том, что экзосомальный секреторный путь вовлечен в транслокацию двух изоформ Hsp90 — Hsp90 $\alpha$  и Hsp90 $\beta$  — на плазматическую мембрану опухолевых клеток.

**ГЕНЫ РИБОСОМНОЙ РНК В ООЦИТАХ ПТИЦ И РЕПТИЛИЙ.** © *E. P. Гагинская, A. Г. Давидьян, E. I. Кошель, A. Г. Демин, A. B. Беляев, C. A. Галкина, A. F. Сайфитдинова. С.-Петербургский государственный университет, elena.gaginskaya@gmail.com*

Растущие ооциты представляют собой высокоспециализированные клетки, в цитоплазме которых аккумулируются и запасаются огромные количества органеллы, макромолекул и других энергоемких соединений, необходимых для осуществления ранних этапов эмбрионального развития. Среди материнского материала РНК, в частности рибосомные РНК (рРНК), важны для работы белок-синтезирующего аппарата зародыша. Разнообразие источников материнских РНК в значительной степени определяет огромное разнообразие способов развития женской половой клетки. Так, высокая транскрипционная активность хромосом, преобразованных в ламповые щетки, и амплификация рибосомных генов с образованием множества экстрахромосомных ядрышек характеризуют гипертранскрипционный тип оогенеза (по: Дондуа, 2005) у представителей рыб, амфибий и ряда низших вторично-ротных. Что касается птиц, в настоящее время господствует представление о том, что в классе Aves особый тип оогенеза определяется полной инактивацией генов рРНК (ядрышкового организатора) и отсутствием ядрышек на фоне высокой транскрипционной активности хромосом типа ламповых щеток в ооцитах у взрослых особей (см. обзор: Gaginskaya et al., 2009), при этом рРНК поступают в ооцит из клеток фолликулярного эпителия (Schjedeide, 1970; Paulson, Rosenberg, 1972). В то же время у неполовозрелых самок ооциты содержат в ядре одно или два истинных ядрышка, которые исчезают в середине стадии ламповых щеток (Чинь, 1977; см. обзор: Koshel et al., 2016; Давидьян и др., 2017). Ситуация похожа на наблюдавшуюся в ооцитах некоторых рептилий (Arronet, 1973; Lutes et al., 2010), однако данные об экспрессии генов рРНК в растущих ооцитах представителей класса Reptilia ограничены и противоречивы.

Доклад представляет материалы исследования экспрессии генов рРНК в оогенезе двух представителей групп

пы Sauropsida, объединяющей классы Aves и Reptilia, — домашней курицы *Gallus g. domesticus* и красноухой черепахи *Trachemys scripta*. Для обоих видов были полностью расшифрованы последовательности рибосомных повторов и сконструированы ДНК-зонды, комплементарные внутреннему транскрибуируемому спейсеру ITS1 в рДНК курицы и внешнему транскрибуируемому спейсеру 3'ETS рибосомного кластера красноухой черепахи. Синтезированные зонды были использованы для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) на криосрезах яичников и на препаратах изолированных из ооцитов ядер и их содержимого. Антитела против белков ядрышка, маркеров репликации (PCNA) и деградации ДНК (TUNEL), а также против коилина использовали для иммунохимического анализа ядерных структур. Получены результаты, которые вносят существенные корректизы в представления о полной инактивации рибосомных генов в ооцитах полновозрелых самок птиц. Так же как и в гонадах неполовозрелых самок, в ооцитах взрослой курицы гены рРНК активны в течение короткого периода роста ооцита от ранней диплотены до начальных этапов стадии ламповых щеток. Функциональная значимость существующего в этот период ядрышка неизвестна, очевидно, что оно не ответственно за формирование пула материнских рРНК в яйцеклетке. В отличие от оогенеза курицы оогенез красноухой черепахи характеризуется амплификацией рДНК и формированием многочисленных экстрахромосомных ядрышек. Природа внутриядерных телец и особенности амплификации рДНК в ооцитах черепахи обсуждаются.

Исследование проведено при финансовой поддержке СПбГУ (тема 1.50.1043.2014) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-04-05684) на базе РЦ СПбГУ «Хромас».

**ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ БЕЛКА p53 В ОТВЕТ НА ДЕЙСТВИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ АГЕНТОВ В ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ E1A+Ras. © О. О. Гнедина,<sup>1</sup> М. В. Иготти, В. А. Постелов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, <sup>1</sup>olga.o.gnedina@gmail.com**

Ранее нами было показано, что обработка фибробластов грызунов, трансформированных онкогенами E1A и cHa-Ras, ингибитором деацетилаз гистонов (HDAC) бутиратом натрия (NaBut) вызывает остановку пролиферации на границе фаз G<sub>1</sub>/S (Abramova et al. 2006, J. Biol. Chem. 281 : 21 040—21 045). Действие ингибитора сборки микротрубочек колцемида и ингибитора топоизомеразы II этопозида также вызывает остановку клеточного цикла и программируемую гибель культуры онкоген-трансформированных клеток (Nakayama et al. 2015. Cell Struct. Funct. 40 : 51—59). Было установлено, что при совместном действии NaBut с этопозидом или колцемидом антипrolиферативный эффект усиливался по сравнению с действием агентов без NaBut. Нами была отмечена разница в степени сенсибилизации трансформированных клеток бутиратом натрия к действию этопозида и колцемида. Так, усиление бутиратом натрия антипrolиферативного действия цитотоксического агента колцемида было в гораздо меньшей степени, чем усиление клеточной гибели при совместном действии NaBut и этопозида. Это указывает на реализацию разных путей передачи сигнала в клетке при действии этопозида и колцемида отдельно и совместно с бутиратом натрия.

Ключевым белком клеточного ответа на стресс и повреждение ДНК является белок опухолевый супрессор p53, активация которого ведет клетку к пролиферативному блоку, reparации ДНК или апоптотической гибели. Одним из механизмов регулирования активности белка p53 в клетке является его фосфорилирование и изменение локализации — перемещение в ядро, где он способен связываться с ДНК и выполнять функции транскрипционного фактора (Ko et al., 1996. Genes, Devop. 10 : 1054—1072). Нами было показано, что при действии колцемида и колцемида/NaBut происходит сильное накопление белка p53 в ядре клеток E1A+Ras, тогда как при использовании другого агента этопозида незначительное увеличение пула ядерного p53 происходило только при его совместном администрировании с NaBut. Установлено, что колцемид вызывал более сильное фосфорилирование белка p53 по остатку Ser-392, чем этопозид. При этом накопление p53, фосфорилированного по Ser-392, индуцированное колцемидом, выявляется как в ядре, так и в цитоплазме клеток E1A+Ras. Тогда как индуцированное колцемидом фосфорилирование по Ser-15 белка p53 выявляется исключительно в цитоплазматических экстрактах. Это указывает на активацию проапоптотической активности p53 при действии колцемида как одного, так и совместно с NaBut.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что цитотоксический агент колцемид как самостоятельно, так и совместно с NaBut вызывает антипrolиферативный эффект в онкогентрансформированных клетках, сопровождающийся активацией транскрипционного фактора p53, тогда как этопозид и этопозид/NaBut действуют независимо от активации p53.

**C-TALE (CHROMATIN-TARGETED LIGATION ENRICHMENT) — НОВЫЙ ПОДХОД К ЦЕЛЕВОМУ ОБОГАЩЕНИЮ 3C-SEQ- И HI-C-БИБЛИОТЕК. © А. К. Голов,<sup>1</sup> А. А. Галицына,<sup>1</sup> А. В. Лужин,<sup>1</sup> С. В. Разин,<sup>1,2</sup> С. В. Ульянов,<sup>1,2</sup> А. А. Гаврилов.<sup>1</sup> <sup>1</sup>Институт биологии гена РАН, Москва, и <sup>2</sup>Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, golovstein@gmail.com**

На протяжении десятилетий изучение укладки эукариотических геномов велось главным образом микроскопическими методами. В последние два десятилетия развиваются методики изучения укладки хроматина, основанные на принципе лигирования ДНК по сближенности (proximity ligation), — С-методы. Эти подходы позволяют изучать пространственную организацию хромосом с разрешением до нескольких тысяч п. о. Совмещение лигирования по сближенности с высокопроизводительным секвенированием (методы 5C, 3C-seq и Hi-C) сделало возможным изучение укладки больших фрагментов хромосом или даже целых геномов без привлечения предварительных гипотез о взаимодействующих участках. Постепенное увеличение глубины секвенирования таких библиотек сопровождалось установлением все более мелких деталей пространственной организации геномов: А- и В-компартментов, топологических доменов и, наконец, петлевых доменов. Для обнаружения петлевых доменов методом Hi-C в клетках млекопитающих потребовалось более 1 млрд парноконцевых прочтений. Таким образом, изучение механизмов образования и поддержания этих структур требует довольно дорогих экспериментов, значительная часть средств в которых расходуется на секве-

нирование. В то же время для изучения универсальных для всех петлевых доменов механизмов достаточно сфокусироваться на нескольких выбранных участках генома. Как раз для решения подобных задач в свое время был предложен метод 5C, но технические сложности до сих пор не позволяют получать с его помощью карты пространственной организации с разрешением, достаточным для надежного обнаружения петлевых доменов. Все это привело к разработке целого ряда протоколов целевого обогащения под общим названием Capture Hi-C. Однако уменьшение расходов на секвенирование в Capture Hi-C во многом компенсируется значительными затратами на химический синтез библиотеки зондов, необходимых для обогащения. Нашей задачей стала разработка протокола для приготовления биотинилированных зондов из бакминдной ДНК, который позволил бы значительно удешевить процедуру Capture Hi-C. Разработанный протокол был назван нами C-TALE (Chromatin TArgeted Ligation Enrichment). В этом протоколе для приготовления зондов используется бакминдная ДНК (ДНК одной или нескольких бакминд, перекрывающих интересующий регион генома), дробленная ультразвуком. К смеси таких фрагментов ДНК лигируются адапторы. Для мечения полученной библиотеки зондов используется ПЦР с биотинилированными праймерами. Биотинилированные ПЦР-продукты в дальнейшем гибридизуются с Hi-C- или 3C-seq-библиотеками. Для достижения максимальной эффективности обогащения мы используем в C-TALE дополнительный раунд гибридизации. Таким способом нам удается добиться обогащения целевыми фрагментами в несколько тысяч раз, сравнимого с обогащением в других протоколах Capture Hi-C. Для построения Hi-C-карт с высоким разрешением в областях обогащения протяженностью до 1.5 млн п. о. нам требуется всего порядка 10 млн парноконцевых прочтений. На полученных нами методом C-TALE Hi-C-картах довольно четко различимы топологические домены и петли. Визуальное сравнение Hi-C-карт, полученных нами методом C-TALE, с картами (полученными конвенциональным Hi-C) тех же участков генома, уже опубликованных другими авторами, указывает на их качественное совпадение. Таким образом, сложная процедура C-TALE не вносит существенных артефактов в первоначальную библиотеку продуктов лигирования. Разработка общедоступного метода исследования пространственной укладки хроматина с разрешением порядка нескольких тысяч п. о., такого как C-TALE, открывает путь для изучения базовых наднуклеосомных механизмов компактизации хроматина в ядре позвоночных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-24-00022).

ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ТРАНСПОРТЕРОВ ГЛЮКОЗЫ В ЭНТЕРОЦИТАХ ТОНКОЙ КИШКИ КРЫСЫ: УЧАСТИЕ В ЭТОМ ПРОЦЕССЕ ЭНДОСОМ И ЛИЗОСОМ.  
 © Н. М. Грефнер,<sup>1</sup> Л. В. Громова,<sup>2</sup> Я. Ю. Комиссарчик.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и <sup>2</sup> Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, norefner@yandex.ru

Транспорт глюкозы через апикальную и базолатеральную мембранны энтероцитов осуществляется переносчиками SGLT1 и GLUT2. Динамика этих процессов в

форме и патологии достаточно хорошо изучена физиологами, в то время как морфологические аспекты остаются неизвестными. В частности, неизвестны пути транспорта этих белков внутри клетки, их связь с внутриклеточными структурами и элементами цитоскелета. В настоящее время исследователи обратили внимание на этот пробел. К сожалению, большинство появляющихся работ выполнено на светооптическом уровне с помощью конфокального микроскопа. Иммуноцитохимические исследования на уровне электронного микроскопа практически отсутствуют. Наши попытки проводить такого рода исследования на препаратах, заключенных в смолу, оказались неудачными, так как белки-транспортеры повреждались в процессе препаратирования. По этой причине для иммуноцитохимического исследования мы использовали ультратонкие криосрезы.

При подготовке препаратов кусочки кишечника крысы фиксировали в смеси 2%-ного формальдегида и 0.1%-ного глутаральдегида на фосфатном буфере. После фиксации образцы инкубировали в растворе глицина, связывающем альдегидные группы, и пропитывали раствором желатина в возрастающих концентрациях (от 2 до 12%). Затем препараты переносили в раствор 2.3 М сахараозы, которая служила криопротектором. Полученные блоки замораживали в этаноле, охлажденном жидким азотом на установке Leica EM GP. Ультратонкие криосрезы получали с помощью криоультратома Leica EM UC7. Срезы после иммуномечения контрастировали смесью водного раствора уранил-ацетата и метицеллюлозы. Окрашенные срезы просматривали на электронном микроскопе Libra 120 (Carl Zeiss).

Результаты исследования показали, что метка к транспортеру SGLT1 расположена преимущественно в области микроворсинок. Метка к транспортеру GLUT2 встречается как в области микроворсинок, так и вблизи базолатеральной мембранны. При усиливании всасывания глюкозы в кишечнике метка к GLUT2 становится многочисленной в области микроворсинок, что свидетельствует о включении GLUT2 в транспорт глюкозы через апикальную мембранию энтероцита.

Метки к транспортерам заключены в везикулы, которые обнаруживаются в разных отделах клетки. Иммуномечение антителами к белкам-маркерам EEA1, RAB7 и LAMP1 показало, что эти мембранные структуры могут являться ранними и поздними эндосомами и (или) лизосомами. Чтобы выяснить, какие именно структуры содержат транспортеры глюкозы, мы использовали двойную иммунную метку к транспортерам глюкозы и эндосомам или лизосомам. Мы обнаружили колокализацию метки к GLUT2 и RAB7 (маркер поздних эндосом), а также колокализацию метки к SGLT1 с метками EEA1 (маркер ранних эндосом) и RAB7. В дальнейшей работе мы планируем более детально рассмотреть взаимодействие транспортеров глюкозы с мембранными структурами клетки и проследить перемещение транспортеров внутри энтероцитов.

Работа выполнена на базе Ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» С.-Петербургского государственного университета.

КОНСЕРВАТИЗМ БЕЛКОВ МЕЙОТИЧЕСКОЙ РЕКОМБИНАЦИИ И ИЗМЕНЧИВОСТЬ ХРОМОСОМНЫХ БЕЛКОВ, СПЕЦИФИЧНЫХ ДЛЯ МЕЙОЗА, В ФИ-

ЛОГЕНЕЗЕ ЭУКАРИОТ. © Т. М. Гришаева, Ю. Ф. Богданов. Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва, grishaeva@vigg.ru

Проведено сравнение последовательностей аминокислот в ортологах белков, специфичных для мейоза, у растения *Arabidopsis thaliana*, грибов *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*, нематоды *Caenorhabditis elegans*, насекомого *Drosophila melanogaster*, рыбы *Danio rerio*, мыши *Mus musculus* и человека. Использован показатель относительного сходства Score в % от максимально возможного сходства «сам на себя». Наиболее консервативным из изученных белков оказался медиатор рекомбинации RAD51 (сходство от 45 % при сравнении нематоды и дрозофилы и до 89—99 % в подтипе позвоночных). Его мейотический гомолог DMC1 есть не у всех организмов, но он не менее консервативен: 49 % сходства между DMC1 *A. thaliana* и *S. cerevisiae* и 89—97 % сходства среди позвоночных. Функциональные домены белков RAD51 и DMC1 несколько более консервативны. Нижние пределы их сходства составляют соответственно 63 и 58 %.

Белки mismatch-репарации MLH1 (важные ферменты механизма кроссинговера) у *A. thaliana* и *S. cerevisiae* имеют лишь 21 % сходства, но сходны на 67—87 % среди позвоночных. Однако их функциональные домены более сходны: 40 % сходства у *A. thaliana* и *S. cerevisiae* и до 97 % в подтипе позвоночных.

Мейоз-специфичная эндонуклеаза SPO11 наименее консервативна среди изученных нами ферментов мейоза. При попарном сравнении между представителями разных типов животных относительное сходство структуры SPO11 не превышало 32 %.

Структурные белки мейотических хромосом мало консервативны. Сходство мейотического когезина REC8 у изученных модельных организмов не превышает 67 % среди млекопитающих и 19 % при сравнении этого белка у рыбы *D. rerio* и мыши. Оно статистически незначимо при сравнении REC8 у двух видов дрожжей, нематоды и дрозофилы. В то же время его соматический гомолог RAD21 достигает 97 % сходства среди млекопитающих, 67 % сходства с ортологом у рыбы и 31 % сходства среди других изученных нами видов. Неконсервативными являются белки синаптонемных комплексов, даже содержащие консервативный домен HORMA. Этот домен среди нескольких белков синаптонемных комплексов в 2—3 раза более консервативен, чем целые молекулы, но это сходство не выходит за пределы 26 % при сравнении домена HORMA у изученных нами представителей растений, грибов и беспозвоночных животных.

Таким образом, среди ключевых белков мейоза наиболее консервативны белки, ответственные за точность мейотической рекомбинации (RAD51, DMC1 и MLH1). Мейоз-специфичная эндонуклеаза SPO11 и структурные белки хромосом — когезины, белки синаптонемных комплексов — менее консервативны даже в пределах их функциональных доменов. Очевидно, что мейоз-специфичные белки претерпели независимую эволюцию в разных филогенетических линиях эукариот. Эти оценки подтверждают предположение о том, что после возникновения мейоза эволюция его молекулярного аппарата шла независимыми путями в разных филогенетических ветвях, но конвергентно приводящими к сходным результатам: сохранению древнего механизма гомологичной рекомбинации хромосом, коррекции ошибок синтеза ДНК при ре-

комбинации и к построению в мейотических клетках функционально сходных вспомогательных ультраструктур — синаптонемных комплексов, формирующихся из негомологичных белков у растений, грибов, животных и человека.

ДЕПОУПРАВЛЯЕМЫЙ ВХОД КАЛЬЦИЯ В КАРДИОМИОЦИТАХ МЫШИ. © К. О. Гусев, В. А. Вигонт, Д. А. Грехнёв, Е. В. Казначеева. Институт цитологии РАН, С.-Петербург.

Депоуправляемый вход  $\text{Ca}^{2+}$  позволяет невозбудимым клеткам поддерживать концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  внутри эндоплазматического ретикулума на достаточном уровне. В электровозбудимых клетках — нейронах — нарушение депоуправляемого входа  $\text{Ca}^{2+}$  было показано при развитии таких нейродегенеративных заболеваний, как болезни Хантингтона и Альцгеймера. В настоящее время существуют противоречивые данные о наличии депоуправляемого входа  $\text{Ca}^{2+}$  во взрослых кардиомиоцитах мыши.

В данной работе с помощью флуоресцентного красителя fura-2 мы зарегистрировали вход  $\text{Ca}^{2+}$ , чувствительный к ингибитору депоуправляемых каналов 2-APB в концентрации 50 мкМ. Дальнейшие исследования позволили оптимизировать условия для активации и регистрации депоуправляемого входа  $\text{Ca}^{2+}$  методом флуоресцентной микроскопии. Последующие измерения с помощью метода фиксации потенциала на мемbrane выявили токи ионов  $\text{Ca}^{2+}$  через селективные каналы с вольтамперной характеристикой, подобной классическим депоуправляемым CRAC каналам и с амплитудой 0.4—0.6 пА/пФ. Данные токи  $\text{Ca}^{2+}$  были также чувствительны к 50 мкМ 2-APB.

Полученные результаты, где нами впервые напрямую зарегистрированы токи  $\text{Ca}^{2+}$ , вызванные опустошением  $\text{Ca}^{2+}$ -депо во взрослых кардиомиоцитах, позволяют предположить, что нарушения данного механизма  $\text{Ca}^{2+}$ -входа могут быть вовлечены в развитие заболеваний сердца аналогично нарушениям, наблюдаемым при нейродегенеративных заболеваниях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-14-00720-П).

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ЯДРЫШКОВОГО ОРГАНИЗАТОРА В РАСТУЩИХ ООЦИТАХ *GALLUS GALLUS DOMESTICUS*. © А. Г. Давидян, Е. И. Кошелев, А. Г. Демин, А. Ф. Сайфитдинова, Е. Р. Гагинская. С.-Петербургский государственный университет, asya.davidian@gmail.com

В процессе оогенеза синтезируется огромное количество всех видов РНК, в том числе рибосомных РНК, для обеспечения ранних стадий эмбриогенеза. Повторяющиеся кластеры рДНК с разделяющими их межгенными спейсерами IGS составляют ядрышкообразующий район хромосом, или ядрышковый организатор (ЯОР), экспрессия которого приводит к формированию ядрышка в ядре эукариотической клетки. Известно, что у большинства птиц ЯОР локализован на единственной хромосоме. У курицы это хромосома 16 (GGA16). На основе данных, полученных ранее методами рутинной микроскопии, радио-

автографии и гибридизации с зондом к рРНК дрозофилы (Гагинская, Грузова, 1975), а также исследования содержимого ядер, изолированных из ооцитов на стадии ламповых щеток, сложилось представление о том, что у птиц в яичниках половозрелых самок ЯОР инактивирован на всех стадиях роста ооцита (Gaginskaya et al., 2009).

Для объяснения феномена инактивированного ЯОР в ооцитах половозрелых птиц выдвигалась гипотеза о существовании в яичнике неполовозрелых самок двух морфологических форм ооцитов, которые различаются наличием или отсутствием ядрышка в ядре, при этом последние получают преимущества в развитии, а ядрышкоодержащие ооциты, вероятно, погибают по пути апоптоза (Гагинская, Чинь, 1980). В нашу задачу входило проверить эту концепцию, используя современные методические подходы.

Анализ популяций ооцитов в целом яичнике цыпленка вскоре после выплания проводили с использованием 3D-реконструкции в программе Amira 6.0 по серийным гистологическим срезам, окрашенным гематоксилином-эозином и метиловым зеленым-пиронином. В проанализированном яичнике выявлены зоны с ооцитами на разных стадиях созревания профазы первого деления мейоза; выявлена передне-задняя и дорсовентральная полярность в созревании ооцитов. Обнаружено, что апоптозу подвергаются ооциты только в кортикальном слое, тогда как в медуллярной зоне апоптоз выявлен только в соматических клетках.

Была прослежена динамика функционирования ЯОР в ооцитах яичников неполовозрелых цыплят разного возраста (от 6 сут до 5 мес после выплания), а также половозрелых кур. Для выявления ядрышка в ооцитах *Gallus gallus domesticus* были применены методы флуоресцентной иммуногистохимии (антитела против фибрillарина) и гибридизации нуклеиновых кислот *in situ* (зонд к пре-рРНК).

По результатам исследования описан идентичный сценарий функционирования ЯОР в яичнике как неполовозрелой, так и половозрелой курицы: ядрышко появляется на ранней диплотене до наступления стадии ламповых щеток, ЯОР функционирует на ранней стадии ламповых щеток, после чего ЯОР инактивируется и ядрышко сегрегирует. Вначале оно распадается на крупные фрагменты, содержащие РНК и белки, а затем на более мелкие гранулы, в которых детектируется фибрillарин и не содержится РНК. Это очень мелкие гранулы, которые распределяются по ядру. С использованием антител против фибрillарина и против коилина на одних и тех же препаратах мы обнаружили, что в ооцитах половозрелых кур эти белки колокализуются во фрагментах ядрышка на всех стадиях его дезорганизации.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта СПбГУ (№ 1.50.1043.2014) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-04-05684); использовано оборудование РЦ СПбГУ «Хромас».

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РНК-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА HUR С УБИКВИТИНЛИГАЗОЙ PIRH2.** © А. А. Дакс,<sup>1</sup> О. А. Федорова,<sup>1</sup> Т. С. Леонова,<sup>1,2</sup> О. Ю. Шувалов,<sup>1</sup> А. В. Петухов,<sup>1,3</sup> Е. А. Васильева,<sup>1</sup> Н. А. Барлев.<sup>1</sup> <sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, <sup>2</sup>С.-Петербургский государственный

университет и <sup>3</sup>Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, alexandra.daks@gmail.com

Белок PIRH2 кодируется геном человека *RCHY* и представляет собой RING-доменсодержащую лигазу E3, специфично модифицирующую остатками убиквитина белки семейства p53. Pirh2-опосредованное убиквитинирование в свою очередь является сигналом для протеасомной деградации белков-мишеней. PIRH2 является транскрипционной мишенью онкосупрессора p53 и его гомологов — p63 и p73. Таким образом, формируется система обратной регуляции, обеспечивающая тонкую настройку активности проапоптотических транскрипционных факторов семейства p53.

Несмотря на свою очевидную онкогенную функцию в отношении p53, p63 и p73, PIRH2 способен играть амбивалентную роль в клетках различных типов рака, и данный аспект требует дополнительных исследований. Например, известно, что помимо p53 данная убиквитинлигаза направляет на деградацию такие ключевые факторы регуляции клеточного цикла, ответа на повреждение ДНК и пролиферации, как Chk2, c-Myc, p27<sup>Kip</sup>, ДНК-полимераза PolH и др. Однако на сегодняшний день информации о мишенях PIRH2 и их роли в канцерогенезе представлено очень мало.

Для более глубокого понимания роли PIRH2 в формировании tumorigенного потенциала клеток мы использовали протеомный подход, в результате чего нами было идентифицировано более 100 новых интерактантов данной убиквитинлигазы. При анализе интерактома PIRH2 мы обратили особое внимание на РНК-связывающий белок HuR (Elav11). Белок HuR является одним из активно исследуемых регуляторов экспрессии генов на посттранскрипционном уровне. Известно, что он связывается с 3'-нетранслируемой областью мРНК своих мишеней и таким образом влияет на их стабильность в клетке. HuR является регулятором таких клеточных процессов, как апоптоз, пролиферация и прохождение по клеточному циклу за счет влияния на экспрессию таких белков, как c-Myc, циклины A, B1, D1 и E, p53 и TNF $\alpha$ . При этом имеется множество свидетельств об онкогенной роли HuR, опосредованной его способностью усиливать пролиферацию и устойчивость клеток к генотоксическим агентам.

В результате нашей работы мы подтвердили, что PIRH2 способен физически связываться с белком HuR *in vitro* и *in vivo*. Мы также продемонстрировали, что PIRH2 является убиквитинлигазой HuR и обеспечивает поли-убиквитинирование данного РНК-связывающего белка, в результате чего HuR подвергается деградации в протеасомах. Кроме того, на клетках HeLa человека было показано, что PIRH2-опосредованная регуляция HuR проявляется в условиях ответа на тепловой шок, негативно влияя как на уровень белка HuR, так и на экспрессию его генов-мишеней.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 16-34-00869 мол\_а и 16-34-60228 мол\_а\_дк).

**РАСПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ ЯДРЫШКОПОДОБНОГО ТЕЛЬЦА В ПОЗДНЕМ ООГЕНЕЗЕ И РАННЕМ ЭМБРИОГЕНЕЗЕ ЧЕЛОВЕКА И МЫШИ.** © М. А. Добринин,<sup>1</sup>

*Н. В. Ильчева,<sup>1</sup> Г. Н. Почукалина,<sup>1</sup> Н. М. Корчагина,<sup>2,3</sup> А. П. Воронин,<sup>1,3</sup> Н. И. Енукашвили.<sup>1</sup>* <sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, <sup>2</sup>Клиника репродукции человека АВА-ПЕТЕР, Санкт-Петербург, и <sup>3</sup>С.-Петербургский государственный университет, nie@newmail.ru

Созревание ооцита сопровождается реорганизацией хроматина и цитоплазматических структур. У большинства млекопитающих при этом образуется характерное внутриклеточное образование — ядрышкоподобное тело (ЯПТ), nucleolus like body. В отряде грызунов ЯПТ формируется на короткое время перед овуляцией на стадии диплотены 1-го деления мейоза. Позднее в эмбриогенезе млекопитающих образуется структура, называемая предъядрышко (ПЯ), предъядрышковое тельце, nucleolar precursor body, имеющая морфологическое сходство с ЯПТ. ЯПТ и ПЯ — внутриклеточные образования, необходимые для формирования компартментализации ядра, определенной локализации хромосом и депонирования материнских РНК и белков. Белковый состав ЯПТ мало изучен. Завершение мейоза сопровождается разборкой ЯПТ. Локализация белков из состава ЯПТ на этой стадии неясна. Неясно, есть ли связь белков ПЯ зиготы с белковым составом ЯПТ преовуляторного ооцита. Целью работы являлось исследование белкового состава ЯПТ в позднем оогенезе человека и мыши и ПЯ в ранней зиготе мыши.

Для стимуляции овуляции самкам мышей (6–10 нед) вводили аналоги фолликулостимулирующего гормона и хорионического гонадотропина. Для получения зигот самок после стимуляции подсаживали к самцам и через 18 ч извлекали зиготы. При работе с ооцитами человека использовали непригодные для целей ВРТ незрелые ооциты на стадиях GV и GVBD из банка донорских ооцитов клиники Ава-Петер. Для всех ооцитов были получены информированные согласия доноров. Ооциты и зиготы фиксировали, первмабилизовывали и окрашивали антителами (АТ) к исследуемым белкам.

У мыши на стадии GV в составе позднего ЯПТ (стадия SN) выявлены белки ламины A, B, TRF2 и DDX5. Актин и топоизомераза II располагались за пределами ЯПТ. В ЯПТ человека ни один из этих белков обнаружен не был. В отличие от мыши АТ к ламину A (но не к ламину C) окрашивали ламину GV даже на стадии SN. АТ к остальным белкам окрашивали только небольшие гранулы по всему объему ооцита. АТ к DDX5 помимо мелких гранул выявляли на стадиях GV и GVBD ооцита человека одно крупное образование размером около 10 мкм. Полученные результаты свидетельствуют о том, что структура ЯПТ у домовой мыши и человека различна.

При разборке ЯПТ и переходе к стадии M2 у мыши TRF2, DDX5, ламины A/C, В были распределены по всему ооциту. После оплодотворения TRF2 и ламины не входили в состав пронуклеусов и расположенных внутри них ПЯ. Напротив, белки, для которых характерна ядрышковая локализация, —  $\alpha$ -фибрillарин и DDX5 — в зиготе перемещались в район формирующихся ПЯ.  $\alpha$ -Фибрillарин был выявлен внутри ПЯ в виде крупных гранул. Полифункциональный гетерохроматинассоциированный DDX5, мигрирующий в ядрышки при активной пролиферации клеток, располагался по периферии ПЯ в виде кольца в областях, ярко окрашиваемых DAPI.

Таким образом, у мыши и человека ЯПТ разбираются в овулирующем ооците. После оплодотворения у мыши в пронуклеусах формируются новые структуры — ПЯ. Структуры ЯПТ и ПЯ при внешнем морфологическом

сходстве различаются по составу. Ламин A/C и TRF2 не ассоциированы с ПЯ в отличие от ядрышковых белков DDX5 и фибрillарина.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 15-15-20026), Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 15-04-01857 и 16-34-00714) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

#### АКТИВАЦИЯ РЕПАРАТИВНЫХ СВОЙСТВ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК СЕРДЦА ПРИ ОСТРОМ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА. © П. М. Докшин,<sup>1</sup> А. Б. Малашичева.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>С.-Петербургский государственный университет и <sup>2</sup>Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, docshin74@icloud.com

Восстановление сократительной функции сердца и регенерация миокарда после ишемического повреждения являются актуальными вопросами современной регенеративной медицины и клеточной биологии. Традиционно считали, что в постнатальном периоде возможности регенерации сердца сильно ограничены или отсутствуют. Однако недавно были описаны стволовые клетки сердца (СКС), способные к кардиогенной дифференцировке, и в настоящее время регенеративный потенциал этих клеток активно изучают. Было установлено, что клетки, находящиеся близ очага повреждения, имеют повышенную экспрессию гена *Notch1*, одного из компонентов сигнального пути Notch, отвечающего за поддержание популяций стволовых клеток.

Целью данной работы было получить СКС непосредственно из зоны инфаркта миокарда, сравнить их с СКС, полученными из участка здорового миокарда, по функциональным свойствам — скорости роста, способности к миграции и дифференцировке. Развитие инфаркта миокарда передней стенки правого желудочка сердца у крыс линии Вистар индуцировали перевязкой коронарной артерии. Через 3 сут из ишемизированного участка получали СКС путем ферментативной диссоциации ткани; в качестве контроля использовали участок здорового миокарда. Полученные линии клеток фенотипировали методом проточной цитометрии. Скорость пролиферации оценивали методом построения кривых роста. Скорость миграции оценивали методом нанесения царапины на монослой клеток. Клетки дифференцировали в кардиогенном, адипогенном и остеогенном направлениях путем добавления в среду культивирования специфических индукторов. Оценку степени дифференцировки проводили методом количественной ПЦР на специфические маркеры дифференцировки, а также окрашивали дифференцированные клетки иммуноцитохимическим методом на специфические маркеры.

Стволовые клетки сердца, полученные из ишемизированных участков миокарда, обладали более высоким пролиферативным потенциалом по сравнению с СКС, выделенными из участков нормального миокарда; скорость миграции и способность к дифференцировке в исследованных направлениях была выше у клеток, происходящих из ишемизированных участков, по сравнению с клетками нормального миокарда. Анализ экспрессии рецепторов и лигандов Notch-сигналинга методом qPCR показал, что гены *Notch2*, *Notch3*, *Notch4*, *Dll-1* и *Jag-1* имеют по-

высокую экспрессию в тканях, взятых из постинфарктного участка миокарда. При остеогенной и адипогенной дифференцировке мы выявили повышенную экспрессию в ишемизированных клетках таких маркеров, как BMP2, одного из значительных компонентов сигнальных путей, участвующего в дифференцировке различных клеток, остеобластного маркера OPN и маркера адипоцитов Fabp4, а в кардиогенной дифференцировке было заметное повышение экспрессии кардиального маркера Actn2.

Таким образом, ишемическое воздействие на миокард при инфаркте приводит к активации внутреннего регенеративного потенциала СКС *in vivo*. Запланированы дальнейшие исследования этого феномена.

**СТРУКТУРА ЯДЕР АНТИПОДАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЗАРОДЫШЕВОГО МЕШКА ПШЕНИЦЫ В ХОДЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ПКГ КОМПЛЕКСА.** © Т. В. Доронина,<sup>1</sup> И. А. Чабан,<sup>2</sup> Е. М. Лазарева.<sup>1,1</sup> Кафедра клеточной биологии и гистологии биологического факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова и <sup>2</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, Москва, matveevatiana.94@yandex.ru

Ранее было показано, что в течение онтогенеза антиподальные клетки (АК) зародышевого мешка злаков последовательно проходят стадии пролиферации, дифференцировки и гибели. Три инициальные АК пролиферируют и образуют комплекс из трех ярусов клеток — базального, граничащего с проводящим пучком, среднего и апикального, контактирующего с эндоспермом. Эндоредупликация ДНК АК начинается строго после окончания их пролиферации. В процессе эндоредупликации ДНК в ядрах антипод формируются гигантские хромосомы. В ходе дифференцировки морфология ядер АК меняется. Целлюляризация синцития эндосперма запускает программируемую клеточную гибель (ПКГ) антипод.

Политенные хромосомы являются результатом функциональной полиплоидизации ядер некоторых тканей. Структура и функции политенных хромосом животных подробно изучены. Политенные хромосомы растений отличаются от хромосом животных, детали их организации не выяснены до сих пор. Неизвестно, что транскрибируют политенные хромосомы растительных клеток и как они погибают.

Комплекс антипод зародышевого мешка злаков — уникальная модель, позволяющая ответить на все эти вопросы. Комплекс располагается на границе между материнским организмом и формирующимся эндоспермом. Основной функцией АК является синтез веществ, необходимых для формирования синцитиального эндосперма.

В настоящей работе проведено сравнительное изучение структуры ядер АК разных ярусов комплекса на стадиях его дифференцировки и гибели. Показано, что ядра АК комплекса различаются по содержанию ДНК. Ядра клеток базального яруса содержат меньше ДНК, а ядра клеток апикального яруса — наибольшее количество ДНК. В процессе дифференцировки содержание ДНК в ядрах комплекса увеличивается, особенно в клетках апикального яруса. На стадии гибели комплекса некоторые клетки апикального и среднего ярусов продолжают активно функционировать, содержание ДНК их ядер увеличивается. На финальных этапах гибели содержание ДНК в ядрах резко падает, так как антиподы начинают пог-

лощаться эндоспермом. На начальных этапах дифференцировки эндополиплоидные ядра антипод имеют одинаковый размер, округлую форму и фибрillлярный хроматин. Позднее овальные ядра клеток среднего и апикального ярусов заметно увеличиваются в размерах, в них различимы отдельные гигантские хромосомы, они содержат от одного до четырех ядрышек и мини-ядрышки. На стадии ПКГ хромосомные территории ядер сближаются, в хроматине образуются лакуны, в которые мигрируют компоненты ядрышка (РНП, фибрillарин и аргентофильные белки). Затем такие ядра сильно уплотняются и поглощаются эндоспермом. В части ядер клеток апикального яруса происходит фрагментация хроматина. Клетки с фрагментированными ядрами поглощаются эндоспермом раньше остальных. В антиподах на стадии гибели наблюдается экструзия компонентов ядрышка и хроматина в эндосперм, что отражает их секреторную функцию.

Полученные данные позволили построить схему изменения структуры ядер комплекса в ходе онтогенеза.

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ КЛЕТОЧНЫХ И ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕЕАСОМ ЧЕЛОВЕКА.** © Е. Е. Дьяконов,<sup>1,2</sup> Т. О. Артамонова,<sup>3</sup> М. А. Ходорковский,<sup>3</sup> А. С. Цимоха.<sup>2</sup> <sup>1</sup>С.-Петербургский государственный университет, <sup>2</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и <sup>3</sup>С.-Петербургский государственный политехнический университет, diakonov2007@mail.ru

26S протеасома — мульти-subъединичный белковый комплекс, отвечающий за избирательную убиквитинизированную деградацию белков в эукариотической клетке. Показано, что протеасомы находятся не только в ядре и цитоплазме клетки, но и в межклеточном пространстве, где они представлены в основном 20S-коровыми комплексами без 19S-регуляторных частиц. Известно, что активность протеасом зависит от посттрансляционных модификаций (ПТМ), которые также влияют и на их внутриклеточное распределение. Мы предполагаем, что транспорт внеклеточных протеасом также может регулироваться с помощью специфических ПТМ протеасомных белков. В связи с этим целью настоящей работы явилось сравнение ПТМ клеточных и внеклеточных протеасом, аффинно очищенных из клеток человека линии K562. После разделения белков протеасом в системе одномерного гель-электрофореза в денатурирующих условиях белковые образцы анализировали с помощью масс-спектрометрии ионно-циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией. Идентификацию белков и ПТМ осуществляли с помощью программ Mascot и Prospector MS-Fit. Согласно данным масс-спектрометрии, мы обнаружили в клеточных и внеклеточных протеасомах соответственно 37 и 46 сайтов фосфорилирования, 6 и 10 сайтов убиквитинирования, 40 и 34 сайта ацетилирования, 6 и 14 сайтов сукцинирования. У клеточных протеасом были фосфорилированы 11 белков из 14 субъединиц 20S-корового комплекса, 3 субъединицы убиквитинированы, 12 ацетилированы и 4 сукцинированы. В то же время у внеклеточных протеасом были фосфорилированы, убиквитинированы, ацетилированы и сукцинированы 13, 5, 11 и 8 субъединиц соответственно. Важно отметить, что некоторые из указанных ПТМ были обнару-

жены впервые. В результате сравнения ПТМ клеточных и внеклеточных протеасом мы получили список из 22 специфических для внеклеточных протеасом ПТМ: 1) фосфорилирование субъединиц  $\alpha 1$  (T231),  $\alpha 4$  (S216),  $\alpha 6$  (S54),  $\alpha 7$  (T186),  $\beta 3$  (S181),  $\beta 5$  (Y125) и  $\beta 6$  (S195); 2) убиквитинирование субъединиц  $\alpha 4$  (K204),  $\beta 3$  (K68, K77 и K201) и  $\beta 6$  (K204); 3) ацетилирование субъединиц  $\alpha 6$  (K39 и K62),  $\beta 2$  (K127 и K238) и  $\beta 3$  (K115); 4) сукцинилирование субъединиц  $\alpha 3$  (K222),  $\alpha 6$  (K115),  $\alpha 7$  (K110) и  $\beta 6$  (K204 и K228). Следует подчеркнуть, что 15 ПТМ из представленного списка обнаружены нами впервые и являются кандидатами для дальнейшего подтверждения их функциональной значимости путем внесения точечных аминокислотных замен.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-14-08128).

**РАСТИТЕЛЬНЫЕ ПОЛИФЕНОЛЫ ИНДУЦИРУЮТ ПОЛИМОРФНЫЙ ФАЗОВЫЙ ПЕРЕХОД ЛИПИДОВ.** © С. С. Ефимова, О. С. Остроумова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ssefimova@mail.ru

Растительные полифенолы характеризуются антиоксидантной, антигистаминной, противовоспалительной, а также антибактериальной активностью. При этом они малорастворимы в воде, что затрудняет их фармакологическое применение. В настоящее время наиболее перспективным способом повышения биодоступности полифенолов является использование их комплексов с липидами, в частности модифицированных ими липидных везикул.

Нами обнаружено, что флавоноиды (флоретин, бутенин, 4'-гидроксихалкон, наргингенин, кверцетин, мирицетин, биоханин А, генистеин, кардамонин, ликохалкон А и ликвидигенин) и фитоалексины (ресвератрол) способны индуцировать полиморфный фазовый переход липидов в суспензии липосом, сформированных из диолеилфосфатидилхолина (ДОФХ). Одноламеллярные липосомы изготавливали методом экструзии и методом электроформации, а мультиламеллярные везикулы формировали при гидратировании липидных пленок. Для каждой из экспериментальных систем варьировали соотношение липид : полифенол от 1 : 1, 1 : 3 к 1 : 5. Наблюдение поведения липидных систем в присутствии полифенолов проводили в проходящем свете с помощью конфокального микроскопа Olympus FV3000 (Германия).

Результаты исследований показывают, что растительные полифенолы индуцируют полиморфный фазовый переход ДОФХ независимо от метода образования везикул. Флоретин, кардамонин, биоханин А, генистеин, кверцетин и мирицетин вызывают появление игольчатых шарообразных небислойных структур, в то время как присутствие в липосомальной суспензии бутенина, наргингенина и ресвератрола приводит к появлению палочкообразных образований. Морфология индуцированных полифенолами небислойных структур не зависит от соотношения липид : полифенол. Добавка в суспензию липосом 4'-гидроксихалкона, ликвидигенина и ликохалкона А в указанных концентрациях не вызывает полиморфного фазового перехода липидов. Полученные результаты указывают на зависимость способности полифенолов индуцировать образование небислойных структур от числа OH-групп в молекуле.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской научного фонда (проект 17-74-10137).

**АДЕНОКАРЦИНОМА ЛЕГКИХ: МЕХАНИЗМЫ, РЕГУЛИРУЮЩИЕ УСТОЙЧИВОСТЬ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ТЕРАПИИ.** © Б. Д. Животовский. Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, Россия, и Институт медицины окружающей среды, Каролинский институт, Стокгольм, Швеция, Boris.Zhivotovsky@ki.se

Рак легких является основной причиной смерти от рака в мире, при этом аденокарцинома легкого (АКЛ) является наиболее распространенным подтипов этого тяжелого заболевания. АКЛ часто диагностируется на поздних стадиях при развитых метастазах. Это особенно важно для разработки новых подходов к терапии АКЛ. Высокая устойчивость АКЛ к радио- и химиотерапии представляет собой серьезную проблему эффективности лечения. Ранее мы обнаружили, что Тюдор стафилококковая нуклеаза (SND1 или TSN) сверхэкспрессируется в линиях клеток и клиническом материале АКЛ и играет важную роль в поддержании химиорезистентности АКЛ. Подавление TSN RNAi в клетках АКЛ приводило к потенцированию гибели клеток в ответ на цисплатин.

Для идентификации потенциальных молекулярных мишней, вовлеченных в сенсибилизацию АКЛ к цисплатину, был проведен глобальный анализ экспрессии генов. При нокдауне TSN наблюдалось более чем двукратное изменение транскрипции 391 гена, причем транскрипция 234 генов была понижена, а 157 — увеличена по сравнению с контрольными клетками. Используя анализ ingenuity (IPA) и степени обогащения онтологий генов, мы остановились на изучении генов, связанных с регуляцией аутофагии и апоптоза, а также выживаемости в ответ на повреждение ДНК. Данные анализа микрочипов подтверждали с помощью q-RT-PCR. На первом месте в списке оказался ген S100A11. Подавление TSN сопровождалось значительным снижением экспрессии S100A11 как на уровне мРНК, так и на уровне белка. Подавление S100A11 RNAi приводило к повышенной чувствительности клеток АКЛ к цисплатину, оксалиплатину и 5-фторурасилу.

Взаимодействие S100A11 с другими белками исследовалось с помощью биоинформационического анализа путей, вовлеченных в апоптоз и устойчивость клеток к цитостатикам. Обнаружено, что в цитоплазме S100A11 взаимодействует с аннексинами A1 и A2 и таким образом ингибирует активность фосфолипазы A2 (PLA2) — фермента,участвующего в каскаде арахидоновой кислоты. Ингибитор PLA2 или siРНК-подход снимали химиосенсибилизацию клеток АКЛ при подавлении S100A11. Таким образом, нами обнаружена цепь событий, включающая в себя TSN-S100A11-PLA2, регулирующая супероксидзависимый апоптоз, инициируемый химиотерапевтическими агентами на основе платины в АКЛ. Эта цепь событий позволяет наладить таргетную терапию АКЛ.

Исследование было выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-25-00056).

**ОЦЕНКА УРОВНЯ КОРОТКОЖИВУЩИХ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В АКТИВИРОВАННЫХ ЭНДО-**

ТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С МЕЗЕНХИМНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ. © О. В. Жидкова, М. И. Ездакова. Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, [flain-fish@yandex.ru](mailto:flain-fish@yandex.ru)

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) являются перспективным инструментом регенеративной терапии. Особую роль в реализации терапевтического эффекта МСК играют паракринные взаимодействия. Помимо хорошо известных цитокинов межклеточная сигнализация осуществляется путем синтеза короткоживущих молекул, оксида азота (ОА) и других активных форм кислорода (АФК). АФК и ОА участвуют в регуляции патологических и физиологических процессов, а также активируют внутриклеточные сигнальные каскады. Введение МСК в сосудистое русло предполагает дальнейшее взаимодействие с клетками сосудистого эндотелия, который является одним из основных продуцентов ОА. Целью данной работы было изучение влияния МСК на индукцию синтеза ОА и АФК в провоспалительно активированных эндотелиальных клетках.

МСК выделяли из стромально-васкулярной фракции жировой ткани здоровых доноров и культивировали в стандартных условиях (5 % CO<sub>2</sub>, ростовая среда с добавлением 10 % фетальной телячьей сыворотки). Эндотелиальные клетки (ЭК) выделяли из пупочной вены и также культивировали при стандартных условиях. За 24 ч до сокультивирования ЭК активировали ФНО-альфа (10 нг/мл), через 1 сут среду заменили на свежую и добавляли суспензию МСК в соотношении 1 : 1. МСК сокультивировали с ЭК 24 ч. Апоптотические и некротические пути гибели клеток детектировали после окрашивания FITC-аннексином и иодидом пропидия, уровень АФК и ОА определяли с помощью флуоресцентных зондов (CM-H2DCFDA и DAF-FM Diacetate, Thermo Fisher Scientific) методом проточной цитофлуориметрии.

В работе использовали модель краткосрочного контактного сокультивирования МСК и ЭК. Сокультивирование не влияло на долю апоптотических и некротических клеток. Методом проточной цитофлуориметрии было показано, что провоспалительная активация ФНО-альфа эндотелиальных клеток вызывает повышение продукции АФК и ОА. Краткосрочное сокультивирование с МСК приводило к повышению продукции оксида азота активированными эндотелиальными клетками в среднем на 30%, однако не влияло на продукцию АФК.

Провоспалительная активация ФНО-альфа приводит к повышению синтеза ОА в ЭК, а краткосрочное взаимодействие с МСК усиливает этот эффект. Таким образом, помимо секреции целого ряда цитокинов регуляторная роль МСК может осуществляться за счет индукции синтеза короткоживущих АФК, например ОА, в эндотелиальных клетках.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 16-15-10407).

ДОМЕН, АССОЦИИРОВАННЫЙ С ЦИНКОВЫМИ ПАЛЬЦАМИ (ZAD) БЕЛКА ZAF1, НЕОБХОДИМ ДЛЯ ПОДДЕРЖАНИЯ ПЕТЕЛЬ ХРОМАТИНА. © Н. А. Золотарев, О. В. Кырчанова, А. Н. Бончук, О. Г. Максименко, П. Г. Георгиев. Институт биологии гена РАН, Москва, [pikolay.zolotarev@yandex.ru](mailto:pikolay.zolotarev@yandex.ru)

Архитектурные (инсуляторные) белки необходимы для поддержания структуры хроматина и сближения промоторов с энхансерами. У дрозофилы описан ряд архитектурных ДНК-связывающих белков (dCTCF, Su(Hw), Zw5, Pita, ZIPIC и др.). Все известные инсуляторные белки дрозофилы взаимодействуют с кофактором CP190. Этот белок не способен связывать ДНК, но с помощью ДНК-связывающих белков привлекается на хроматин. CP190 участвует в поддержании открытого хроматина и преимущественно локализуется на промоторах генов.

В этой работе нами описан новый архитектурный белок CG6808, который мы назвали ZAF1 (ZAD domain Architectural Factor 1). На N-конце этого белка расположен домен, ассоциированный с цинковыми пальцами (ZAD), на C-конце находится кластер из пяти цинковых пальцев «C2H2»-типа. Такая структура характерна и для некоторых других архитектурных белков — Zw5, Pita и ZIPIC. Мы ранее показали, что ZAD-домены этих белков образуют гомодимеры. Используя сшивку белков глутеральдегидом и коэкспрессию белков в клетках *E. coli*, мы обнаружили, что ZAD-домен ZAF1 также специфично димеризуется. Подобно другим инсуляторным белкам ZAF1 связывается с кофактором CP190. С помощью дрожжевой двугибридной системы мы определили, что для взаимодействия необходим участок из 25 аминокислот в средней части белка.

Используя метод иммунопреципитации хроматина с последующим глубоким секвенированием (ChIP-seq), мы выявили 307 пиков связывания для ZAF1. Найденные пики часто находятся в промоторах генов и совпадают с пиками CP190. В последовательностях пиков ZAF1 мы обнаружили обогащенный мотив, с которым белок связывается напрямую.

Ранее, используя модельную систему на основе гена *white*, ответственного за пигментацию глаз, мы показали, что сайты связывания белков Zw5, Pita и ZIPIC способны поддерживать петли хроматина. ZAF1 не экспрессируется в глазных имагинальных дисках, что позволило нам модернизировать нашу модельную систему. Мы экспрессировали ZAF1 и его делеционные производные под контролем тканеспецифичного промотора. Используя такой вариант модельной системы, мы показали, что ZAF1 проявляет энхансерблокирующую активность и способен поддерживать петли ДНК. Однако белок без ZAD-домена теряет эти активности. ZAF1 без участка взаимодействия с CP190 продолжает блокировать энхансеры, но не способен поддерживать петли ДНК. Таким образом, важной функцией ZAD-домена является организация хроматиновых петель.

Так как ZAF1 структурно похож на ранее описанные архитектурные белки Zw5, Pita и ZIPIC, мы предполагаем, что домены, ассоциированные с цинковыми пальцами, важны для функционирования многих архитектурных белков.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-24-00166).

ИЗМЕНЕНИЕ ИММУНОСУПРЕССИВНОЙ АКТИВНОСТИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИЧЕСКОГО СТРЕССА. © К. В. Зорникова, А. Н. Горностаева, Е. Р. Андреева. Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, [kse2574@yandex.ru](mailto:kse2574@yandex.ru)

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) — стромальные предшественники, способные дифференцироваться по различным направлениям и влиять на репарацию, регенерацию и иммунный ответ. Благодаря этим свойствам, в особенности иммуносупрессии, МСК являются перспективным инструментом для клеточной терапии и регенеративной медицины.

Хорошо известно, что в тканях организма концентрация кислорода составляет 1—10 %. В данной работе изучено влияние краткосрочного гипоксического влияния на иммуносупрессорные способности МСК, постоянно культивируемых при уровне  $O_2$ , близком к тканевому (5 %), в отношении активированных мононуклеаров крови (МНК).

МСК из жировой ткани здоровых доноров постоянно культивировали при 5 %  $O_2$ . Для моделирования условий гипоксического стресса клетки помещали в гипоксическую камеру с содержанием  $O_2$  менее 1 % на 24 ч. После этого МСК сокультивировали при 5 %  $O_2$  с активированными фитогемагглютинином МНК из периферической крови. Анализ популяционного состава агранулярных лейкоцитов, субпопуляционный состав Т-клеток, их активацию и пролиферацию проводили с помощью проточной цитофлуориметрии.

Гипоксический стресс не повлиял на способность МСК подавлять пролиферацию МНК, однако супрессивная активность в отношении ЕК-Т-, ЕК-клеток и В-лимфоцитов была снижена. Анализ изменения доли Т-клеток, несущих маркеры активации CD25 и HLA-DR, показал, что МСК после гипоксического стресса меньше подавляют Т-клетки, несущие маркер поздней активации HLA-DR. Среди клеток, адгезировавших к МСК после гипоксического стресса, было отмечено снижение доли моноцитов и увеличение доли ЕК-Т-клеток.

Изменение популяционного состава адгезированных лейкоцитов после гипоксического стресса может указывать на нарушение иммуносупрессии, опосредованной прямыми контактами клетка—клетка. В целом полученные данные дают основание полагать, что гипоксический стресс в местах повреждения ткани может негативно сказываться на иммуномодуляторном потенциале МСК.

**ПРОЦЕССИНГ  $\alpha$ -ТУБУЛИНА В РЕЗУЛЬТАТЕ ВЗАЙМОДЕЙСТВИЯ С ПРОТЕАСОМОЙ.** © Е. Ю. Иванова,<sup>1,2</sup> Т. О. Артамонова,<sup>3</sup> М. А. Ходорковский,<sup>3</sup> А. С. Цимоха.<sup>2</sup> <sup>1</sup>С.-Петербургский государственный университет, <sup>2</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и <sup>3</sup>Центр нанобиотехнологий С.-Петербургского политехнического университета Петра Великого, ivanova027@gmail.com

Мультисубъединичный белковый комплекс, отвечающий за избирательную деградацию большинства белков в эукариотической клетке, называется 26S протеасомой. Существует ряд белков с известными и неизвестными функциями, которые постоянно или краткосрочно связываются с протеасомами. Определение белков, взаимодействующих с протеасомами, является одним из ключевых этапов в понимании функций протеасом в клетке и механизмов их регуляции. Для решения этой задачи на примере клеток миелогенной лейкемии человека мы использовали стратегию аффинной очистки 26S протеасом с последующим масс-спектрометрическим анализом. С помощью MALDI-ICR-масс-спектрометрии идентифицированы все субъединицы 26S протеасомы, а также регуля-

торы РА200 и РА28γ. Среди ассоциированных с протеасомами белков мы обнаружили компоненты убиквитин-протеасомной системы, белки теплового шока и некоторые белки цитоскелета (актин, β-актинин 4 и α- и β-тубулины). Вестерн-блот-анализ с использованием антител, специфичных к α-тубулину (*TUBA4A*), выявил присутствие в комплексе с очищенными протеасомами укороченной формы белка с мол. массой, соответствующей 40 кДа в системе SDS-электрофореза. Известно несколько генов α- и β-тубулинов, все они высококонсервативны как между собой, так и между видами. Для многих белков семейства α-тубулинов (48—49 кДа) показано существование различных изоформ — результат альтернативного сплайсинга. Мы полагаем, что наблюдаемая укороченная изоформа α-тубулина, однако, появляется в результате процессинга протеасомами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-04-08128) и Российского научного фонда (проект 16-14-10343).

**ТАНДЕМНЫЕ ПОВТОРЫ IN SILICO И IN SITU В ГЕНОМЕ КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА *CRICETULUS GRISEUS*.** © Н. Г. Иванова, В. Н. Стефанова, Д. И. Островский. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, vestefan@mail.ru

Тандемные повторы (ТП) — минимально изученный и максимально изменчивый компонент генома. Для изучения изменчивости ТП в качестве модельных объектов использовали хомяков рода *Cricetulus* и близкого рода *Mesocricetus*. В базе данных собранных геномов присутствуют сборки геномов двух представителей *Cricetinae* (*Cricetidae*, *Rodentia*): *Mesocricetus auratus* (сирийский хомячок) и *Cricetulus griseus* (китайский хомячок). Клады, включающие в себя *Mesocricetus* и *Cricetulus*, разошлись в эволюции 7—12 млн лет назад. ТП сирийского хомячка были охарактеризованы ранее (Михеев и др., 2015), поэтому задачей настоящей работы стала характеристика ТП китайского хомячка.

Для этого вида известны два клонированных ТП — HC2sat и Sau1.5 по номенклатуре Repbase. ТП Sau1.5 является хромосомоспецифичным и располагается в центромерном и субцентромерном районах на малом плече 5-й хромосомы. Длина мономера Sau1.5 составляет 33 п. н. С помощью Fiber-FISH показали, что этот ТП организован в два поля, каждое из которых занимает 250—500 т. п. н. (Faravelli et al., 1998). Этому ТП соответствует найденное нами семейство ТП CG-33A.

С помощью ранее разработанных методов (Komissarov et al., 2011; Михеев и др., 2015) *in silico* были найдены ТП в трех сборках генома китайского и сирийского хомячков. ТП, отсортированные по максимальному содержанию в базах ридов, показывают ограниченное перекрывание наборов ТП у хомячков разных родов. Не обнаружено ни одного ТП, существующего в геномах обоих родов. Следовательно, хомячки являются чрезвычайно перспективным объектом для доказательства различий наборов ТП в родственных геномах.

Для анализа использовали сборку АРМК, сделанную на основе секвенирования ДНК сортированных хромосом, что позволяет предсказать распределение ТП по хромосомам. Номенклатура ТП включает в себя длину моно-

мера (цифра) и букву-индекс, если у ТП одна длина мономера, но разные последовательности.

С помощью метода FISH на хромосомах китайского хомячка картировали 11 наиболее представленных в геноме ТП. Для гибридизации использовали короткие синтетические одноцепочечные нуклеотидные зонды, специфичные для каждого исследуемого семейства ТП. Идентификацию хромосом китайского хомячка проводили согласно международной номенклатуре (Ray, Mohandes, 1976). В отличие от рода *Mus* (мыши) (Stefanova et al., in press) у китайского хомячка позиции ТП, предсказанные *in silico* и выявленные *in situ* на определенных хромосомах, совпадают лучше. Распределение сигналов сильно отличается от ранее изученных животных (мышь и свинья). Все пробы дают очень сильный сигнал на двух парах хромосом: на 5-й паре и одной из пар маленьких хромосом (9—10-я пара). ТП 84A, содержащий фрагмент Zn-finger домена, который до сих пор выявляли на всех хромосомах у всех проанализированных видов, расположен на 7 хромосомах с максимальным сигналом на паре маленьких хромосом. Интенсивность сигналов варьирует на разных хромосомах, что свидетельствует о количественном различии содержания ТП. Но в отличие от мыши или сирийского хомячка ни одна проба не дает сигнала на всех хромосомах, что свидетельствует об отсутствии общего для всего генома мажорного ТП.

Определение роли и функций самого быстро эволюционирующего компонента геномов — тандемных повторов — невозможно без их классификации. Геном китайского хомячка оказался уникальным как по локализации, так и по составу классифицированных и картированных ТП.

**РЕДОКС-СТАТУС СТВОЛОВЫХ И ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК.** © Ю. С. Иванова, Н. А. Пуговкина, И. В. Кожухарова, И. С. Смирнова, Н. Н. Никольский, О. Г. Люблинская. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ju.s.ivanova@yandex.ru

Поддержание физиологического уровня активных форм кислорода (АФК) необходимо для нормальной жизнедеятельности клеток. Согласно опубликованным данным (Armstrong et al., 2010; Dannenmanna et al., 2016), считается, что стволовые клетки обладают специфическим редокс-статусом по сравнению с дифференцированными клетками. Эта специфичность характеризуется пониженным уровнем АФК и повышенным уровнем экспрессии генов антиоксидантных ферментов. Эмбриональные стволовые клетки человека (ЭСК) обладают характеристиками, существенно отличающими их от дифференцированных клеток. Бластоциста, из внутренней клеточной массы которой они выделены, изначально находится в условиях гипоксии, а сами ЭСК содержат митохондрии с незрелыми кристами. Целью данной работы было сравнить редокс-статус и редокс-регуляцию клеточной пролиферации мезенхимных стволовых клеток эндометрия (эмСК), ЭСК, а также дифференцированных потомков ЭСК — дифЭСК.

Для оценки редокс-статуса нами были измерены такие параметры, как уровень внутриклеточных АФК и скорость элиминации внеклеточной перекиси водорода, величины которых оказались существенно ниже в культурах ЭСК по сравнению с эмСК и дифЭСК. Однако нормированные на величину клеточного объема значения

данных параметров оказались очень близки друг к другу. Таким образом, обнаруженная первоначально разница при сравнительном анализе стволовых и дифференцированных клеток была преимущественно вызвана различием в клеточных размерах, а не наличием особого редокс-статуса. В этой работе было также показано, что внутриклеточный уровень АФК осциллирует при продвижении клеток по пролиферативному циклу, а направленное изменение редокс-баланса с помощью антиоксидантов приводит к замедлению пролиферации и блоку клеточного цикла в фазе  $(G_0)/G_1$ . Кроме того, наблюдаемый блок пролиферации сопровождается понижением уровня циклина A, что было ранее показано также и для других линий дифференцированных, в том числе и опухолевых, клеток (Havens et al., 2006).

Таким образом, данная работа свидетельствует о том, что основные редокс-параметры и принципы участия АФК в регуляции пролиферации являются схожими как для стволовых клеток, так и для их дифференцированных потомков.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской научного фонда (проект 14-50-00068).

**ТРАНСКРИПЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ В ПОЗДНИХ ВИТЕЛЛОГЕННЫХ ООЦИТАХ ТРАВЯНОЙ ЛЯГУШКИ *RANA TEMPORARIA*.** © Н. В. Ильинева,<sup>1</sup> Д. Ю. Киришина,<sup>2</sup> Л. С. Адонин,<sup>1, 3</sup> Г. Н. Почукалина,<sup>1</sup> О. И. Подгорная.<sup>1, 2, 3</sup> <sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, <sup>2</sup> С.-Петербургский государственный университет и <sup>3</sup> Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, nad9009@yandex.ru

Ооциты на стадии поздней диплотены характеризуются значительным снижением транскрипционной активности. В это время хромосомы конденсируются и собираются в ограниченном объеме ядра с образованием кариосфера. У травяной лягушки *Rana temporaria* кариосфера окружена внешней капсулой, состоящей из фибрillлярного компонента, в который включены многочисленные белковые тельца. Целью настоящей работы было исследование транскрипционной активности ооцитов *R. temporaria* V и VI стадий развития.

Для определения локализации компонентов системы сплайсинга проводили непрямое иммунофлуоресцентное окрашивание антителами Y12 к Sm-белкам мяРНК и антителами K121 к 5'-триметилгуанозиновому кэпу мяРНК. На V стадии мяРНК локализованы в мелких гранулах размером 1—2 мкм, ассоциированных с хромосомами, а также в более крупных гранулах (3—5 мкм), распределенных по волокнистому компоненту капсулы, которые предположительно являются Б-снерпосомами. На VI стадии мяРНК расположены только в Б-снерпосомах. Sm-белки мяРНП выявлены в Б-снерпосомах и в волокнистом компоненте капсулы кариосферы на V и VI стадиях.

Для определения сайтов транскрипции проводили микроинъекции BrUTP в ооциты с последующим иммунофлуоресцентным окрашиванием ядер антителами к BrUTP. Обнаружено, что на V стадии хроматин сохраняет остаточную транскрипционную активность, в то время как на VI стадии включение BrUTP практически не наблюдается. Локализацию транскриптов, синтезированных в ядре ооцита на V стадии, определяли методом FISH. Для приготовления зонда из лизата ядер выделяли

хроматиноассоциированную фракцию РНК, проводили обратную транскрипцию с вырожденными гекса-праймерами и мечение полученной кДНК биотинилированным dUTP. В качестве контроля использовали зонды, полученные из нуклеоплазменной и цитоплазматической фракций РНК ооцита. Обнаружено, что РНК, транскрибируемая в ооците на V стадии, остается в ядре и распределяется по волокнистому компоненту капсулы кариосфера. В дальнейшем планируется провести секвенирование РНК, синтезируемой в поздних вителлогенных ооцитах *R. temporaria*, чтобы выяснить роль этих транскриптов в оогенезе и раннем эмбриогенезе.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 16-34-00714 и 15-04-01857) и Российского научного фонда (проект 15-15-20026).

**ДИНАМИН, КОРТАКТИН И ARP2/3-КОМПЛЕКС НЕОБХОДИМЫ ДЛЯ ПЕРЕХОДА ЭФР-РЕЦЕПТОРНЫХ КОМПЛЕКСОВ ИЗ РАННИХ ЭНДОСОМ В ПОЗДНИЕ.** © Р. С. Каменцева,<sup>1</sup> В. В. Кошеверова,<sup>1</sup> М. В. Харченко,<sup>1</sup> Е. С. Корнилова.<sup>1,2</sup> <sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и <sup>2</sup>С.-Петербургский государственный университет, rkamentseva@yandex.ru

Эндоцитоз различных поверхностных рецепторов в комплексе с их лигандами играет важную роль как в обеспечении клетки питательными веществами, так и в проведении сигнала от сигнальных рецепторов, таких как рецепторные тирозинкиназы (РТК). Так, одна из классических РТК, рецептор эпидерmalного фактора роста (РЭФР), при связывании с ЭФР интернализуется и направляется в лизосомы, где происходит деградация лиганд-рецепторных комплексов. Одним из важнейших этапов на пути лизосомной деградации является переход груза из ранних Rab5/EEA1-позитивных эндосом в поздние Rab7-положительные. На основании исследования эндоцитоза липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и бычьего сывороточного альбумина (БСА) долгое время считалось, что этот переход осуществляется посредством так называемой Rab5/Rab7-конверсии, т. е. замещения ГТФазы на одном и том же участке мембранны путем диссоциации Rab5 и привлечения из цитоплазмы на мембрану Rab7. Однако методом приживленной микроскопии нами было показано, что в ходе эндоцитоза РЭФР происходит образование гибридных везикул, содержащих Rab5, EEA1 и Rab7, а затем сегрегация мембранных доменов, в результате которой образуются Rab5/EEA1-позитивная везикула и везикула, несущая Rab7 и ЭФР. По стериометрии процесс сегрегации эндосомальных везикул схож с интернализацией на плазматической мемbrane, в которой, как известно, участвуют динамин и актин, полимеризующийся с помощью Arp2/3-комплекса и кортактина. В связи с этим целью данной работы было узнать, вовлечены ли эти белки в сегрегацию Rab5- и Rab7-позитивных доменов в ходе эндоцитоза РЭФР. С помощью иммунофлуоресцентной конфокальной микроскопии мы показали, что кортактин через 15—30 мин после добавления ЭФР локализуется между заякоренными друг с другом EEA1- и ЭФР-позитивными везикулами. Также при добавлении через 5 мин после стимуляции эндоцитоза ингибиторов динамина и Arp2/3-комплекса

(динасор и СК666) количество таких заякоренных везикул было больше и на более поздних этапах эндоцитоза. С помощью приживленной микроскопии мы подтвердили, что эти везикулы долгое время движутся, как связанные между собой, но не способные сегрегировать полностью, в то время как в контрольных, необработанных ингибиторами клетках, РЭФР/Rab7-положительные домены выделяются из гибридной везикулы уже через 20—40 мин после стимуляции эндоцитоза. Таким образом, несмотря на то что формирование доменов на мембране эндосомы происходит и при подавлении активности динамина и Arp2/3 комплекса, они, вероятно, играют ключевую роль в окончательном разделении мембран не только при интернализации на плазматической мембране, но и при образовании поздних эндосом.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068) и финансовой поддержке ФАНО с использованием оборудования ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ.

**ВЛИЯНИЕ МУТАЦИИ ARG90PRO В  $\gamma$ -ТРОПОМИОЗИНЕ, АССОЦИИРОВАННОЙ С ВРОЖДЕННОЙ ДИСПРОПОРЦИЕЙ ТИПОВ МЫШЕЧНЫХ ВОЛОКОН, НА КОНФОРМАЦИОННЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ АКТИНА В АТФазном ЦИКЛЕ.** © О. Е. Карпичева,<sup>1</sup> А. О. Симонян,<sup>1,2</sup> Ч. С. Рэдвид,<sup>3</sup> Ю. С. Боровиков.<sup>1</sup> <sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, <sup>2</sup>С.-Петербургский государственный университет и <sup>3</sup>Оксфордский университет, Оксфорд.

Изучение влияния мутаций в сократительных белках, связанных с различными наследственными миопатиями человека, на молекулярные механизмы мышечного сокращения необходимо для ранней диагностики заболеваний и разработки терапевтических подходов к их лечению. В настоящей работе с помощью флуоресцентных зондов ФИТЦ-фalloидина, специфически связанных с актином в мышечном волокне, были исследованы изменения в конформационном состоянии актиновой нити в присутствии точечной мутации Arg90Pro в  $\gamma$ -тропомиозине, ассоциированной с врожденной диспропорцией типов мышечных волокон, при моделировании разных состояний цикла гидролиза АТФ. Заболевание характеризуется мышечной слабостью, гипотонией и гипотрофией мышечных волокон первого типа. С помощью электрофоретического разделения белков мышечных волокон продемонстрировано, что, несмотря на то что аминокислотный мотив Arg90-Arg91 тропомиозина участвует в электростатическом взаимодействии с Asp25 актина, Arg90Pro-мутантный тропомиозин сохраняет способность встраиваться в тонкие нити мышечного волокна. Методом поляризационной микрофлуориметрии установлено, что мутация ингибирует переход актиновой нити во включенное состояние при моделировании сильных форм связывания актина и миозина, существенное для активации гидролиза АТФ в головке миозина. Показанный для мутации Arg90Pro эффект является противоположным по сравнению с эффектом мутации Arg91Gly в  $\beta$ -тропомиозине, связанной с другим скелетно-мышечным заболеванием — дистальным артритопозом, характеризующимся первичными гиперократительными эффектами, в том числе увеличением относительного количества включенных актиновых мономеров.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 17-14-01224).

**РАЗРАБОТКА ИСКУССТВЕННОГО СОСУДА МАЛОГО ДИАМЕТРА НА ОСНОВЕ БИОДЕГРАДИРУЕМОГО ПОЛИМЕРА, ЗАСЕЛЕННОГО СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ КОСТНОГО МОЗГА.** © В. Б. Карпович,<sup>1,2</sup> Ю. А. Нащекина,<sup>2</sup> П. О. Никонов,<sup>2</sup> Н. М. Юдинцева.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Первый С.-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова и <sup>2</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

По данным Всемирной организации здравоохранения, заболевания сердечно-сосудистой системы — главная причина инвалидизации и смертности населения в развитых странах мира, при этом фатальным патофизиологическим механизмом является ишемия органов и тканей.

Основным способом лечения сердечно-сосудистых заболеваний, связанных с облитерацией кровеносных сосудов, являются шунтирующие операции. В качестве шунтов используют аутовены или аутоартерии. Однако отсутствие собственных необходимых вен или артерий в результате их поражения или проведения повторных операций у 30 % пациентов приводят к необходимости использования альтернативных сосудистых протезов. Несмотря на экономическую доступность и удобство в применении, синтетические и биологические протезы диаметром менее 6 мм не могут быть использованы в качестве шунтов, так как существует высокий риск их быстрой облитерации в результате обширной гиперплазии неонитмы или тромбообразования. Таким образом, существует острая необходимость разработки альтернативных протезов. Цель работы — разработка искусственного биодеградируемого сосуда малого диаметра в условиях *in vitro*, заселенного мезенхимными стромальными клетками (МСК) костного мозга.

В качестве материала для создания сосуда использовали полимер молочной кислоты — поли-L,L-лактид, который обладает рядом свойств, необходимых для использования в регенеративной медицине: отсутствие токсичности, механическая прочность, биодеградация и др. Было приготовлено два варианта каркасов с различной толщиной стенки. В приготовленные сосуды вносили суспензию МСК. В условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора сосуды оставляли на 3 ч с целью создания условий для максимальной адгезии клеток, затем добавляли питательную среду (статический способ посева клеток). Подобную процедуру повторяли 3-кратно. После 7 сут культивирования с помощью криотома были сделаны криосрезы сосудов толщиной 15—20 мкм и выполнена оценка присутствия и состояния клеток, окрашенных DAPI (4,6-диамино-2-фенилиндол дигидрохлорид), с помощью конфокального микроскопа (Leica TCS SP5). В обоих исследуемых вариантах клетки адгезировали на стенки сосудов и образовывали плотный монослой.

Предполагается проведение дальнейших исследований с целью оценки физико-механических свойств приготовленных сосудов, разработка динамического способа заселения клеток и последующая имплантация наиболее оптимального варианта сосуда на модели лабораторных животных (крысы).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068).

**КАРИОТИП, РОСТОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ, СТАРЕНИЕ, ДИФФЕРЕНЦИРОВКА В ПРОЦЕССЕ ДЛИТЕЛЬНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДВУХ ЛИНИЙ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ ВАРТОНОВА СТУДНЯ ПУПОЧНОГО КАНАТИКА ЧЕЛОВЕКА.** © А. М. Кольцова, Т. А. Крылова, А. С. Мусорина, В. И. Турилова, Т. К. Яковleva, Г. Г. Полянская. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, poljansk@incras.ru

Актуальной задачей клеточной биологии является сравнительный анализ мезенхимных стволовых клеток (МСК) человека, выделенных из разных источников. Изучение характеристик, определяющих статус МСК и ответственных за важнейшие клеточные процессы, способствует углублению фундаментальных знаний о МСК человека и расширению возможностей их использования в регенеративной медицине. Целью данной работы являлась характеристика двух линий МСК, выделенных из Вартонова студня пупочного канатика человека в процессе длительного культивирования. Клетки обеих линий анализировали на раннем 6-м пассаже и на поздних 28-м и 13-м пассажах, на которых клетки линий MSCWJ-1 и MSCWJ-2 соответственно находятся в фазе активного старения. Увеличение в обеих линиях среднего времени удвоения клеточных популяций при длительном культивировании, с 26.8 до 41.0 ч, коррелирует с морфологическими изменениями, связанными с увеличением размеров клеток, в большей степени в MSCWJ-2, и с постепенным увеличением активности β-галактозидазы, что свидетельствует о наступлении репликативного старения. Межлинейные различия связаны с уровнем пролиферативной активности, динамикой индекса пролиферации, временем входления в активную фазу старения, соответствующим 30 удвоениям (13 п.) в линии MSCWJ-2 и 60 удвоениям в MSCWJ-1 (28 п.). Линия MSCWJ-2 имеет большую долю стареющих клеток (80 %) по сравнению с MSCWJ-1 (58 %).

Количественный кариотипический анализ показал, что линии на ранних и поздних пассажах имеют нормальный кариотип человека 46, XX и 46, XY соответственно. При структурном кариотипическом анализе в линиях обнаружена цитогенетическая гетерогенность, связанная с низкой частотой как клональных, так и неклональных хромосомных аберраций. В процессе культивирования спектр аберраций может меняться. Обнаружено, что на 6-м пассаже в разных клеточных популяциях одной линии (MSCWJ-1) могут присутствовать разные аберрации, в обоих случаях исчезающие на позднем пассаже, т. е. эти аберрации носят случайный характер. Исключение составляет 1 клональная хромосомная аберрация, представляющая собой дупликацию большей части короткого плеча хромосомы 7, наблюдаемая с высокой частотой в линии MSCWJ-2 (39 % клеток). При продолжении культивирования до 13-го пассажа она также исчезает, не являясь, по-видимому, адаптивно выгодной для клеточной популяции. Тем не менее в линии MSCWJ-2 обнаружены корреляции между часто встречающейся клональной хромосомной перестройкой на раннем пассаже и ранним репликативным старением с большой долей стареющих клеток, со значительным снижением индекса пролиферации при длительном культивировании и снижением дифференцировочного потенциала, выражющегося в отсутствии хондрогенной дифференцировки на позднем пассаже. Учитывая наличие метаболической кооперации между клетками, можно с осторожностью предположить,

что изменения в MSCWJ-2 связаны с запуском клеточных процессов, которые продолжаются уже в отсутствие часто встречающейся на раннем пассаже клональной хромосомной аберрации. Надо подчеркнуть, что хромосомные перестройки, встречающиеся с низкой частотой, по-видимому, не влияют на основные характеристики МСК, изученные в данной работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФАНО по государственному заданию № 0124-2016-0007 и дополнительному государственному заданию на период 01.07.2017—31.12.2017.

**РЕПЛИКАТИВНЫЙ СТРЕСС В МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА, ИНДУЦИРОВАННЫЙ ОБРАБОТКОЙ АНТИОКСИДАНТАМИ.** © Ю. С. Корниенко,<sup>1,2</sup> И. С. Смирнова,<sup>1</sup> Н. А. Пуговкина,<sup>1</sup> В. В. Зенин,<sup>1</sup> Н. Н. Никольский,<sup>1,2</sup> О. Г. Люблинская.<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и <sup>2</sup>С.-Петербургский политехнический университет Петра Великого, kornienko.js@gmail.com

В настоящее время негативное влияние повышенного внутриклеточного уровня активных форм кислорода (АФК) на клеточную жизнедеятельность не вызывает сомнений для всех типов клеток. Считается, что окислительный стресс является неотъемлемой составляющей развития многих заболеваний человека, а также процесса старения организма. Благотворное влияние антиоксидантов в случае индуцированного окислительного стресса в моделях *in vivo* и *in vitro* было подтверждено большим количеством научных работ, однако вопрос влияния антиоксидантов на здоровые клетки, поддерживающие физиологический уровень АФК, до сих пор не до конца изучен.

В настоящей работе исследован ответ пролиферирующих мезенхимных стволовых клеток человека (МСК) на обработку субцитотоксическими дозами различных антиоксидантов. Под субцитотоксическими дозами подразумеваются высокие терапевтические концентрации антиоксидантов, которые широко используются в других исследованиях для защиты клеток от окислительных повреждений. Добавление антиоксидантов в таких концентрациях приводит к существенному понижению уровня АФК в МСК, но не оказывает цитотоксического воздействия. Было показано, что обработка МСК рядом антиоксидантов различной природы и различных механизмов действия (tempol, resveratrol, DPI) одинаковым образом влияет на их пролиферацию. Добавление антиоксидантов в ростовую среду пролиферирующих культур МСК приводит к ингибированию синтеза ДНК и накоплению разрывов ДНК в течение S-фазы клеточного цикла, активации ответа на повреждения ДНК и дальнейшему блокированию пролиферации в G<sub>2</sub>/M-фазах клеточного цикла. В то же время обработка антиоксидантами покоящихся МСК, напротив, не оказывает генотоксического воздействия и блокирует самообновление клеток в поздней G<sub>1</sub>-фазе. Таким образом, высокие концентрации антиоксидантов способны вызывать репликативный стресс пролиферирующих культур МСК. Кроме того, наблюдавшиеся эффекты сопровождались нарушением регуляции клеточного цикла МСК. Было обнаружено, что антиоксиданты стимулируют деградацию ключевых регуляторных белков, необходимых для корректного протекания фазы син-

теза ДНК — циклина А, геминина и Emi1. Было также показано, что после 1-суточной инкубации с антиоксидантами пролиферирующих культур МСК и последующего перевода на свежую среду без антиоксидантов клетки не восстанавливают свою пролиферацию. При этом были обнаружены повышение активности ассоциированной со старением β-галактозидазы, а также активация белков-ингибиторов клеточной пролиферации (понижение уровня p-Rb, а также накопление p-p53, p21). Таким образом, обработка пролиферирующих культур МСК субцитотоксическими дозами антиоксидантов различного происхождения и различных механизмов действия вызывает репликативный стресс, нарушение регуляции клеточного цикла и дальнейший запуск программы индуцированного стрессом преждевременного старения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-50-00068).

**ОСОБЕННОСТИ РОСТА МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПУПОЧНОГО КАНАТИКА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БЕССЫВОРОТОЧНЫХ СРЕД И СРЕД С ПОНИЖЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ СЫВОРОТКИ.** © А. В. Котова,<sup>1,2</sup> А. Н. Шумеев,<sup>1,2,4</sup> Т. Л. Золина,<sup>2</sup> К. А. Левчук,<sup>2</sup> Л. В. Александрова,<sup>2</sup> Н. И. Енукашвили,<sup>1</sup> Д. А. Иволгин.<sup>2,3</sup> <sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, <sup>2</sup>ООО «Покровский банк стволовых клеток», Санкт-Петербург, <sup>3</sup>Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова, Санкт-Петербург, и <sup>4</sup>Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург.

Мезенхимные клетки пупочного канатика человека являются перспективным инструментом для клеточной терапии. Для культивирования мезенхимных стволовых клеток широко используются среды, содержащие фетальную бычью сыворотку, что создает риск контаминации и аллергических реакций при клиническом применении. Чтобы избежать подобных рисков, компаниями-производителями разрабатываются как полностью бессывяроточные среды, так и среды с заменителем сыворотки с пониженным содержанием животных компонентов.

Целью работы являлось определение иммунофенотипа, морфологии и пролиферативного потенциала МСК пупочного канатика (ПК) при культивировании в присутствии фетальной сыворотки, в бессывяроточной среде и среде с заменителем сыворотки с пониженным содержанием животных компонентов. МСК ПК культивировали в течение 14—16 сут (4 пассажа) на средах: 1) StemPro® MSC SFM CTS™ (Life Technologies) — бессывяроточной среде с пониженным содержанием животных компонентов; 2) StemPro® MSC SFM XenoFree (Life Technologies) — полностью бессывяроточной среде без компонентов животного происхождения, в обоих случаях использовали флаконы, покрытые CELLstart™CTS™ Substrate (Life Technologies); 3) MesenPRO RST™ (Life Technologies) — среде с пониженным (2 %) содержанием сыворотки; 4) DMEM Low Glucose, содержащей 10 % ASCM Mesenchymal Stem Cell Growth Supplement (HyClone). Морфологическую характеристику МСК проводили при анализе фотографий случайно выбранных полей зрения (n = 15), полученных с использованием светового инвертированного микроскопа Axiovert 40C (Zeiss). Методом проточной цитометрии определяли иммунофенотип МСК

ПК и его соответствие минимальным критериям МСК (CD90+/CD105+/CD73+/CD44+/CD34-/CD45-/CD14-/CD117) на 1-м и 4-м пассажах. Показано, что в каждой из использованных сред на 1-м пассаже морфология и иммунофенотип основной части популяции соответствовали МСК. Однако в средах 1, 3 и 4 наблюдалась небольшие (до 1.5 %) субпопуляции клеток, не являющихся МСК. При использовании среды 2 популяция МСК была однородной и не содержала субпопуляций. При продолжении культивирования на 4-м пассаже в среде 2 произошло открепление клеток от субстрата. В среде 1 к 4-му пассажу в клетках резко (на 40 %) снизился уровень экспрессии основных маркеров МСК — CD90 и CD105. В средах 3 и 4 клетки сохранили иммунофенотип МСК, активно пролиферировали, однако сохранялась одна из минорных (не более 1 %) субпопуляций со сниженным содержанием CD44. Таким образом, среда 2 является оптимальным выбором для короткого (1—2 пассажа) культивирования, поскольку не содержит животных компонентов и обладает максимальными селективными свойствами в отношении МСК. Для более длительного (3—4 и более пассажей) культивирования требуется присутствие компонентов животного происхождения. Наиболее высокую активность пролиферации продемонстрировали клетки, культивируемые на средах 3 и 4.

**ПОДАВЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ MEK/ERK В Ras-ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ СТАРЕЮЩИХ ТРАНСФОРМАНТАХ ИНДУЦИРУЕТ АУТОФАГИЮ, ЗАВЕРШАЮЩУЮСЯ АПОПТОЗОМ.** © Е. Ю. Кочеткова,<sup>1</sup> Г. И. Блинова, М. Г. Мартынова, О. А. Быстрова, В. А. Поступов, Т. В. Поступова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, <sup>1</sup>lena.linnaea@gmail.com

Мутации малой ГТФазы Ras выявлены примерно в 30 % опухолей, имеющих плохой прогноз. Онкогенный Ras приводит к конститутивной активности нижележащего Raf/MEK/ERK-каскада и комплекса mTORC1. Изучение антипопролиферативного действия ингибиторов Ras-пути показало, что неэффективность их действия связана с активацией цитопротективной аутофагии и приобретением резистентности к ингибиторам Ras-пути за счет компенсаторной активации других сигнальных путей, в частности PI3K-АКТ-mTOR-сигналинга. Ингибирирование в опухолевых клетках активности mTORC1 приводит к активации компенсаторных сигнальных путей, включая MEK/ERK, благодаря которым mTORC1-комpleksы реактивируются. В связи с этим разрабатываются стратегии комбинированного действия на опухолевые клетки ингибиторов Ras-ERK и mTOR-сигналинга. Альтернативной противоопухолевой стратегией для Ras-экспрессирующих клеток является индукция программы клеточного старения. Однако, несмотря на подавление пролиферации, клетки сохраняют жизнеспособность, а также развиваются ассоциированный со старением гиперсекреторный фенотип, способствующий трансформации клеток микроокружения. Кроме того, подавление активности mTORC1-сигнального пути может приводить к отмене основных маркеров старения и восстановлению пролиферативного потенциала стареющих клеток. В связи с этим разработка новых подходов для элиминации стареющих опухолевых клеток представляется перспективным способом достижения максимально эффективного уничтожения Ras-экс-

пресирирующих опухолевых клеток. В работе проведено сравнение эффективности антипопролиферативного действия ингибитора MEK/ERK-пути PD0325901 (PD) на контрольные и стареющие опухолевые клетки *E1A+cHa-Ras* (*ERas*). Старение индуцировали ингибитором деацетилаз гистонов бутиратом натрия (NaBut). Показано, что в контрольных *ERas*-клетках подавление MEK/ERK-пути приводит к повреждению внутренней структуры митохондрий и активации цитопротективной аутофагии, в результате которой поврежденные митохондрии удаляются и восстанавливаются жизнеспособность клеток. Однако хотя ингибирование MEK/ERK-пути в стареющих клетках также ведет к повреждению митохондрий и активации аутофагии, жизнеспособность клеток не восстанавливается и пролиферация клеток не возобновляется. Причина лежит в том, что в индуцированных к старению клетках *ERas* при ингибировании MEK/ERK-пути не активируется цитопротективная форма аутофагии. Это связано с пространственным разобщением лизосом и аутофагосом, которые попадают в разные компартменты клетки, характерные для гипертрофного, гиперсекреторного фенотипа. Это является причиной неспособности стареющих клеток формировать аутофаголизосомы. Следствием нарушения аутофагического процесса является накопление поврежденных митохондрий и активных форм кислорода, что индуцирует апоптотическую гибель клеток, согласно данным по фрагментации ДНК. Ингибирование MEK/ERK-пути в стареющих клетках приводит к более выраженному падению жизнеспособности и клоногенной выживаемости, чем одновременное подавление MEK/ERK-пути и mTOR-сигналинга. Таким образом, полученные нами данные позволяют сделать вывод о том, что использование индуктора старения HDACi и ингибитора MEK/ERK-пути является перспективной стратегией элиминации Ras-трансформированных опухолевых клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской научного фонда (проект 14-50-00068).

**ВЫЯВЛЕНИЕ EEA1-ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО КОМПАРТМЕНТА И ЕГО РОЛЬ В ЭНДОЦИТОЗЕ ГРУЗОВ, НАПРАВЛЯЕМЫХ НА ДЕГРАДАЦИЮ В ЛИЗОСОМЫ.** © В. В. Кошеверова,<sup>1,\*</sup> М. В. Злобина,<sup>2</sup> Р. С. Каменцева,<sup>1</sup> М. В. Харченко,<sup>1</sup> Е. С. Корнилова.<sup>1</sup> <sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и <sup>2</sup>Central European Institute of Technology, Czech Republic, \*kosheverova\_vera@incras.ru

Одним из ключевых событий на эндоцитозном пути является процесс гомотипического слияния ранних эндосом. В результате слияний площадь поверхности эндосом увеличивается, что позволяет формировать инвагинации мембранны внутри эндосомы с образованием внутренних пузырьков поздних эндосом, куда отсортировываются грузы, направляемые на деградацию. Аутоантител ранних эндосом EEA1 опосредует первичное заякоривание эндосом друг с другом, что необходимо для их последующего слияния. Согласно общепринятой гипотезе, при стимуляции эндоцитоза EEA1 рекрутируется из цитозоля на мембрану сформированной из плазматической мембранны везикулы путем взаимодействия с малой ГТФазой Rab5 и фосфатидилинозитол-3-фосфатом. Считается, что в ходе созревания Rab5 покидает мембрану эндосомы, что приводит к диссоциации белка EEA1 и его возвраще-

нию в цитозольный пул, т. е. EEA1-везикулы рассматриваются как временные структуры, которые выявляются в клетке только на ранних этапах эндоцитоза в составе эндосом с грузом. Однако мы обнаружили, что в клетках HeLa, культивируемых длительное время в условиях минимальной эндоцитозной активности, белок EEA1 преимущественно выявлялся не в цитозоле, а в составе везикул, располагающихся в оклоядерной области. Анализ поведения рецептора эпидермального фактора роста — груза, который преимущественно подвергается лизосомной деградации, — показал, что стимуляция эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов в клетках не изменяла общего количества EEA1, ассоциированного с мембранами. Добавление ЭФР к клеткам приводило к перераспределению пула EEA1-везикул из оклоядерной в подмембранный область и образованию гибридных ЭФР-EEA1-положительных эндосом, сохранявших доменную организацию. Позднее мы наблюдали сегрегацию ЭФР-содержащих везикул от EEA1-везикул, в результате EEA1-везикулы восстанавливали свой пул как по количеству, так и по локализации, тогда как ЭФР-рецепторные везикулы становились Rab7-положительными.

Также мы обнаружили, что EEA1-везикулы обладают свойством селективного взаимодействия с грузом, направляемым на лизосомную деградацию. Так, в отличие от длительного (в течение 30—40 мин) взаимодействия с везикулами, содержащими ЭФР-рецепторные комплексы, EEA1-везикулы лишь краткосрочно (первые 5 мин) взаимодействуют с везикулами, несущими подвергающийся рециклированию трансферрин.

Кроме того, результаты проведенных нами экспериментов свидетельствуют в пользу происхождения EEA1-везикул из биосинтетического пути. Во-первых, добавление ингибиторов рецепторопосредованного эндоцитоза и макропиноцитоза не приводило к снижению числа EEA1-везикул в клетках, что указывает на то, что они не являются производными эндоцитозного пути. Во-вторых, EEA1-везикулы практически не колокализуются в клетках с маркером аутофагосом LC3, что свидетельствует о том, что EEA1-везикулы не являются аутофагосомами. Вместе с тем ингибитор биосинтетического пути Брефельдин А приводил к уменьшению числа EEA1-везикул в клетках. Все эти данные позволяют рассматривать EEA1-везикулы как предсуществующий раннеэндосомальный компартмент, функция которого заключается в обеспечении слияния транспортных везикул с грузом, направляемым на деградацию в лизосомы.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068) и ФАНО России.

**НОВЫЕ АСПЕКТЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ АМПЛИФИЦИРОВАННОЙ рДНК В ЯДРЕ НА МОДЕЛИ ООЦИТОВ *TRACHEMYS SCRIFTA*. © Е. И. Кошель,\* А. Г. Давидян,\* А. Г. Демин, А. Ф. Сайфитдинова, А. В. Беляев, С. А. Галкина, Е. Р. Гагинская (\*равный вклад в получение описанных результатов). С.-Петербургский государственный университет, e.koshel39@gmail.com**

Ключевая роль генов рибосомной РНК (рРНК), входящих в состав ядрышкообразующих районов (ЯОР) хромосом, в формировании ядрышка и биогенезе рибосом хорошо известна. Кроме обеспечения работы белоксинте-

зирующего аппарата клетки доказано участие ядрышка в таких процессах, как пролиферация клеток, старение, апоптоз, стрессовый сигналинг, участие в развитии клеточных патологий, ассоциированных с канцерогенезом и нейродегенеративными заболеваниями. Несмотря на значительный прогресс в исследовании нуклеологенеза и функций ядрышка, многие аспекты функционирования ЯОР остаются слабо изученными. В частности, механизмы амплификации генов рРНК исследованы на ограниченном наборе биологических объектов. Судьба амплифицированной рДНК в ядре ооцита также практически не исследована. Расширить представления о механизмах амплификации и о функционировании амплифицированной рДНК в клетке сможет исследование этого процесса на новых биологических моделях. Подходящим объектом для этого исследования могут служить ооциты рептилий, в частности черепах, в которых предположительно ЯОР амплифицируется. Ранее этот феномен, как и функциональная морфология ядра ооцита черепах в целом, не были изучены.

В настоящем исследовании было изучено функционирование ЯОР в ооцитах у самок красноухой черепахи *Trachemys scripta* разного возраста с использованием криосрезов яичников и микрохирургически выделенных ядер. Для выявления рДНК и ее транскриптов был разработан ДНК-зонд к внешнему транскрибируемому спейсеру 5'ETS на основе впервые собранного нами кластера генов рРНК. Для анализа белковых компонентов ядрышек и других ядерных компартментов были использованы антитела к фибрillарину, нуклеолину, коилину, FLASH (FLICE-associated huge protein), дЦДНК и PCNA (proliferating cell nuclear antigen). Интернуклеосомнную фрагментацию ДНК выявляли методом TUNEL. 3D-анализ структуры ядра осуществляли при использовании конфокальной микроскопии после окраски ядер флуорохромами, специфичными к ДНК или РНК, и проведения иммунохимического анализа.

По результатам настоящего исследования мы описываем оригинальный сценарий функционирования ЯОР при его амплификации в процессе роста ооцита черепахи. Во всех амплифицированных ядрышках выявлена двухцепочечная экстрахромосомная, активно транскрибируемая рДНК, количество, форма и положение которой в ядрышках меняются в процессе роста ооцита в соответствии с изменением формы и размера самих ядрышек. Накопление рДНК в ядрышках, судя по всему, обусловлено новыми циклами репликации амплифицированных копий ЯОР при участии пролиферативного фактора PCNA. На основе полученных результатов мы можем предположить также, что амплифицированная рДНК в дальнейшем может подвергаться эндонуклеазной фрагментации. Помимо новых данных по функционированию ЯОР при его амплификации в ооците черепахи нами была получена уникальная информация о структуре ядра ооцита у представителей этого отряда рептилий и выявлены новые ядерные компартменты.

Исследование реализовано при финансовой поддержке грантов СПбГУ (1.50.1043.2014) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-04-05684), а также при использовании оборудования РЦ СПбГУ «Хромас».

**РОЛЬ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНОГО КРАУДИНГА В ОРГАНИЗАЦИИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ПРОСТРАНСТВА**

ВА. © И. М. Кузнецова, К. К. Туроверов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, kkt@incras.ru

В течение двух последних десятилетий произошли кардинальные изменения представлений о живой материи как на уровне организации пространственной структуры белков, их фолдинга, функционирования, роли в различных клеточных процессах, так и на уровне их участия в организации внутриклеточного пространства. На смену достаточно механистической модели организации живой материи, согласно которой функция белков определяется их жесткой глобулярной структурой, а внутриклеточные процессы происходят в жестко детерминированных компартментах, ограниченных мембраной, возникло представление о том, что в основе всего живого лежит высокодинамичная и высокофункциональная «мягкая материя».

Было достигнуто понимание того, что белки могут быть функционально активны не только в глобулярном состоянии, но и частично или полностью внутренне неупорядоченном состоянии. Глобулярную структуру в нативном состоянии имеют в основном ферменты — белки, функция которых строго детерминирована. Частично или полностью внутренне неупорядоченную структуру в нативном состоянии имеют белки системы регуляции и передачи сигналов, участвующие во взаимодействии с большим числом партнеров, которым для функционирования требуется гораздо большая структурная лабильность. В основе осуществления белками их функции в клетке лежит их взаимодействие с другими биологически активными соединениями, в том числе с макромолекулами других белков, нуклеиновыми кислотами, полисахаридами, рибонуклеопротеидами и т. д., суммарная концентрация которых во внутриклеточном пространстве может достигать 400 мг/мл. Вслед за англоязычной литературой, где эта особенность клеточного пространства была описана впервые и где такие условия стали называть Macromolecular Crowding условиями, и в русскоязычной научной литературе стал использоваться термин «макромолекулярный краудинг». Такие условия приводят к практически полному отсутствию незанятого пространства и к ограниченному количеству свободной воды. Исследования последних лет показали, что макромолекулярный краудинг имеет решающее значение в организации внутриклеточного пространства. Наиболее существенное значение при этом имеет то обстоятельство, что в водных растворах биополимеры могут смешиваться, т. е. равномерно распределяться в растворе только при их низкой концентрации. При высокой концентрации полимеров в водном растворе, т. е. в условиях макромолекулярного краудинга, они разделяются на фазы. Согласно современным представлениям, в результате обратимого высококонтролируемого в биологических системах фазового перехода жидкость—жидкость могут возникать высокофункциональные и высокодинамичные немембранные органеллы, функциональная активность которых определяется внешними условиями (температура, pH среды, концентрация ионов, концентрация осмолитов и т. п.) и которые могут возникать или исчезать в ответ на сигналы, поступающие от других компартментов клетки.

Изучение немембранных органелл в настоящее время является одним из самых животрепещущих вопросов функциональной протеомики клетки. Очевидно, что столь революционные изменения представлений об организации живой материи должны учитываться в медици-

не. Необходимо разрабатывать методы диагностики и рационального использования лекарственных средств с учетом того, что эти методы и лекарства должны быть направлены не на клетку в целом, а на отдельные компартменты клетки, функциональная активность которых может существенно изменяться при патологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-24-00131) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

ИЕРАРХИЯ УРОВНЕЙ КОМПАКТИЗАЦИИ ХРОМАТИНА В МИТОТИЧЕСКИХ ХРОМОСОМАХ *NIGELLA DAMASCENA*. © М. А. Кузнецова. Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

Организация генома и механизмы его компактизации в составе живой клетки являются одними из основных вопросов современной биологии. Большая часть экспериментальных данных о структурной организации митотических хромосом относится к нескольким видам млекопитающих с относительно маленьким геномом. Но у некоторых растений и животных хромосомы имеют многократно больший размер. Структурные механизмы, позволяющие увеличить размер хромосом, изучены слабо. Целью настоящей работы является изучение уровней компактизации хроматина в составе митотических хромосом *Nigella damascena* L. Изучение компактизации хромосом требует мечения дискретных локусов хромосом, что сложно сделать при работе с растениями. Мы разработали новый метод мечения реплицирующегося хроматина в клетках корешков растений. Для этого использовали введение нуклеотида EdU в поздней S-фазе, когда метка выявлялась в виде обособленных блоков. Выявление EdU проводили с помощью click-реакции на полутонких срезах корешков, заключенных в акриловую смолу LR White, что позволило добиться высокого разрешения по оси z (в 3–4 раза выше, чем в конфокальной микроскопии). Мы обнаружили, что при переходе от ранней к поздней профазе меченные локусы хромосом теряют линейность расположения, что свидетельствует о сворачивании (фолдинге) «раннепрофазной» хромосомы. Более детальная характеристика уровней компактизации была проведена с использованием электронно-микроскопической морфометрии. Мы обнаружили, что в ранней профазе хромосомы, контуры которых выявляются плохо, образованы фибриллами диаметром ~150 нм (хромонемами). При переходе к средней профазе обособляются «раннепрофазные» хромосомы диаметром ~500 нм, образованные хромонемами. В поздней профазе эти хромосомы сворачиваются в хромосомы диаметром ~800 нм, что сопровождается уменьшением диаметра «ранне-профазных» хромосом до ~300 нм и приводит к невозможности выявить хромонемы в их составе. В телофазе происходит деконденсация хроматид, что приводит к обособлению компонентов, соответствующих «раннепрофазным» хромосомам (~400 нм), и хромонем. При этом в осевой области хроматиды формируется полость, что говорит о принципиально ином принципе организации фибриллы, соответствующей «раннепрофазной» хромосоме, чем у животных, для которых характерна повышенная плотность хроматина в осевой области. Таким образом, ис-

пользование сочетания методов позволило выявить иерархию уровней компактизации хроматина у растения с большим геномом. Дальнейшие исследования позволят уточнить принцип фолдинга хроматиновых фибрill у видов с большим геномом.

**ЭКСПРЕССИЯ ЭСТРОГЕНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ В КЛЕТКАХ КУМУЛЮСА РАСТУЩИХ ИЛИ ЗАВЕРШИВШИХ ФАЗУ РОСТА ООЦИТОВ *SUS SCROFA DOMESTICUS*.** © Т. И. Кузьмина,<sup>1</sup> И. Я. Шахтамиров,<sup>2</sup> Х. М. Мутиева,<sup>2</sup> В. Ю. Кравцов.<sup>3</sup><sup>1</sup> Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных, Санкт-Петербург—Пушкин, <sup>2</sup>Чеченский государственный университет, Грозный, и <sup>3</sup>Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург, prof.kouzmina@mail.ru

В механизмы приобретения женской гаметой способности к реинициации мейоза и его завершению вовлечены как соматические клетки фолликула (клетки кумулюса — КК — и гранулезы), так и сам ооцит, секретирующий ряд факторов, контролирующих дифференцировку и функциональную активность клеток. Прижизненный BCB-тест, используемый для оценки функционального статуса ооцита (растущие — BCB<sup>-</sup> или завершившие фазу роста — BCB<sup>+</sup>-ооциты) животных выявил высокие потенции BCB<sup>+</sup>-ооцитов свиней к созреванию и развитию эмбрионов, полученных из них, по сравнению с BCB<sup>-</sup>-ооцитами (Ericsson et al., 1993. Theriog. 39 : 214). Известно, что эстрadiол ингибирует ядерно-цитоплазматическое созревание ооцитов свиней *in vitro* (Dode, Graves. 2003. Anim. Repr. Sci. 78 : 99—110). Для идентификации механизмов влияния эстрadiола на формирование яйцеклетки и выявление биомаркеров завершенности фазы роста женской гаметы представляет интерес сравнительный анализ экспрессии эстрогеновых рецепторов (ЭР) в КК растущих или завершивших фазу роста ооцитов. В настоящем исследовании иммуноцитохимическим (ИЦХ) методом оценен уровень экспрессии рецепторов к эстрогену в КК BCB<sup>+</sup>- и BCB<sup>-</sup>-ооцитов. Для экспериментов использовали постмортальные яичники свиней в фолликулярной фазе, породы ландрас, в возрасте 6—8 мес. Ооциты с равномерной по ширине зоной пеллюцида, гомогенной ооплазмой, окруженные не менее чем 5—6 слоями КК, выделяли из фолликулов диаметром 3—6 мм. Для оценки функционального статуса ооциты 60 мин инкубировали в 13 мкМ BCB (B-5388), растворенном в PBS при 38.5 °C. КК пипетированием отделяли от ооцита и проводили ИЦХ-окрашивание с помощью кроличьих поликлональных антител к ЭР (NCL-HPr, Novocastra) с последующей визуализацией стандартной ABC-системой (Vectrum). В качестве субстрата для проявления ИЦХ-реакции использовали 3,3'-диаминонебензидин (ДАБ, Novocastra) и гематоксилин. Оценку степени экспрессии ЭР проводили по системе Hystochemical score (HScore). Анализ экспрессии ЭР осуществляли с использованием микроскопа Leica DM-4000B. Показатель HScore в выборке BCB<sup>-</sup>-ооцитов ( $n = 28$ ) оказался значительно ниже (более чем в 3 раза), чем в выборке BCB<sup>+</sup>-ооцитов ( $n = 52$ ), и соответствовал слабой ИЦХ-реакции — 80 (менее 100). BCB<sup>+</sup>-ооциты имели достоверно более высокую оптическую плотность антигена ЭР, чем BCB<sup>-</sup>-ооциты ( $p < 0.05$ , U-критерий Уилкоксона—Манна—Уитни). Для подтверждения полученных данных было проведено количественное измерение плотности антигена с применением пакета морфометрических программ. Полученные данные подтвердили представленные выше результаты. Показатель «яркость оптической плотности» модального класса BCB<sup>-</sup>-ооцитов составил 0.35 усл. ед., в то время как у модального класса BCB<sup>+</sup>-ооцитов — 0.45 усл. ед. ( $p < 0.001$ , U-критерий Уилкоксона—Манна—Уитни).

Таким образом, уровень экспрессии ЭР в КК, окружающих ооциты свиней, завершивших фазу роста, значительно превышает таковой в КК, окружающих растущие ооциты. С учетом имеющихся данных литературы об ингибирующем влиянии эстрadiола на ядерно-цитоплазматическое созревание ооцитов свиней *in vitro* следует резюмировать, что полученные нами результаты могут свидетельствовать в пользу выдвинутой ранее гипотезы о блоке мейоза ооцитов, завершивших фазу роста, на стадии диплотены перед его реинициацией и участии в этом процессе эстрadiола.

**ГЕНОМ ЯПОНСКОГО ПЕРЕПЕЛА *COTURNIX JAPONICA*: ЗАПОЛНЕНИЕ ПРОБЕЛОВ МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЦИТОГЕНЕТИКИ.** © М. М. Кулак,<sup>1</sup> А. С. Комиссаров,<sup>1</sup> В. Фийон,<sup>2</sup> К. Марро,<sup>2</sup> Д. Паркин,<sup>3</sup> Д. Дамас,<sup>3</sup> А. Г. Демин,<sup>1</sup> А. Ф. Сайфитдинова,<sup>1</sup> Д. Гриффин,<sup>4</sup> С. А. Галкина.<sup>1</sup> <sup>1</sup>С.-Петербургский государственный университет, Россия, <sup>2</sup>Национальный институт сельскохозяйственных исследований, Франция, <sup>3</sup>Королевский ветеринарный колледж Университета Лондона, Великобритания, и <sup>4</sup>Университет Кента, Великобритания, ontica@mail.ru

Японский, или немой, перепел *Coturnix japonica* имеет относительно небольшой геном (1.41 пг), упакованный в 39 пар хромосом. Первый проект его расшифровки был представлен в 2013 г. (Kawahara-Miki et al., 2013). С 2016 г. доступна сборка генома перепела, состоящая из 32 групп сцепления ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=coturnix+japonica](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=coturnix+japonica)). В сборке полностью отсутствует информация о последовательностях 10 хромосом (хромосомы СJA29—38). Это связано с использованием секвенированного генома домашней курицы (собранного не полностью) в качестве референсной последовательности. Кроме того, значительное число пробелов и неточностей обусловлено присутствием районов, содержащих повторяющиеся последовательности и другие некодирующие фрагменты, анализ которых автоматизированными биоинформатическими методами крайне затруднителен. Важно отметить, что повторяющиеся элементы ДНК играют решающую роль в реорганизации структуры хромосом и регуляции экспрессии генов, в частности генов, отвечающих за проявление качественных и количественных признаков. Подобные данные необходимы для определения генетических механизмов проявления количественных признаков, являющихся предметом наиболее пристального анализа в геномной селекции перепела.

В настоящей работе мы провели общую ревизию выполненной геномной сборки методами молекулярной цитогенетики, а также идентифицировали и локализовали в геноме новые повторы, уникальные для японского перепела. В качестве зондов при проведении сравнительной гибридизации (ZOO-FISH) на митотических хромосомах перепела были использованы 74 BAC-кллона, содержащих фрагменты геномной ДНК домашней курицы из библиотеки CHORI-261. BAC-кллоны были отобраны по содер-

жанию консервативных кодирующих последовательностей с минимальным количеством повторов и могут быть использованы в качестве универсальных маркеров синтенных блоков (Damas et al., 2016). Рассчитанные индексы Flpter и точная локализация использованных BAC-клонов на картах секвенированных последовательностей позволили сравнить их положение *in situ* и *in silico* в геномах перепела и курицы. Выявлено более 70 внутрихромосомных перестроек, при этом хромосомы 10, 15, 17, 21, 23, 24, 26 и 28 сохраняют стабильность в течение 35 млн лет раздельной эволюции этих двух видов.

На втором этапе с использованием баз данных «сырых» последовательностей полногеномного секвенирования перепела были идентифицированы 22 новых тандемных повтора и определена их копийность. Наиболее высококопийные повторы занимают более 30 млн.п.н. в геноме *C. japonica*. С помощью FISH на митотических хромосомах и хромосомах-ламповых щетках перепела показано, что тандемный повтор Cjap858A располагается в центромерном районе хромосом CJA1,2,4. Последовательности Cjap31A, Cjap28C и Cjap40A преимущественно располагаются на коротких плечах микрохромосом. Обсуждается архитектурная роль тандемных повторов в трехмерной организации ядра.

Исследование ведется при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-04-01823а) на базе РЦ СПбГУ «ЦКП Хромас».

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ СИГНАЛОВ ЯДЕРНОЙ И ЯДРЫШКОВОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ.** © М. А. Курнаева,<sup>1</sup> М. Ю. Шубина,<sup>2</sup> Я. Р. Мусинова.<sup>1,3</sup> <sup>1</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, <sup>2</sup>Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова и <sup>3</sup>Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, musinova.yana@gmail.com

Накопление белков в ядре и субдоменах клеточного ядра (например, в ядрышке) может реализовываться при помощи различных молекулярных механизмов. Наиболее изученный способ накопления белков в ядре связан с наличием сигналов ядерной локализации (NLS), которые обеспечивают энергозависимый трафик белков в ядро. Накопление белков в ядрышке может обеспечиваться наличием сигналов ядрышковой локализации (NoLS). NLS часто перекрываются с NoLS, хотя причины этого неясны, что, по-видимому, связано с плохой изученностью механизмов действия NoLS. Ранее мы получили данные в пользу того, что накопление белков в ядрышке может быть связано с электростатическим взаимодействием обогащенных положительно заряженными аминокислотами NoLS с компонентами ядрышка. Для дальнейшего анализа мы использовали Tat-белок вируса иммунодефицита человека (HIV-1), в котором картированы перекрывающиеся NLS и NoLS (совпадают с основным доменом белка). Замена любой вне зависимости от положения заряженной аминокислоты основного домена на незаряженную приводит к ослаблению накопления белка в ядрышке. Величина ослабления накопления не зависела от положения замененной аминокислоты. При замене не-

скольких аминокислот снижение накопления было пропорционально числу замененных заряженных аминокислот. Напротив, снижение накопления Tat-белка в ядре зависело от положения замененной аминокислоты. Также накопление Tat-белка в ядре значительно ослаблялось после истощения клеточного пула АТФ. Таким образом, последовательность основного домена Tat-белка позволяет функционировать этому домену в качестве NLS, а обогащенность положительно заряженными аминокислотами (общее свойство всех классических NLS) — накапливать белок еще и в ядрышке. Аналогичные данные получены при анализе GAR-домена фибрillарина. Этот домен отвечает за накопление фибрillарина в ядре и, будучи обогащен аргининами, способен обеспечивать накопление фибрillарина в гранулярном компоненте ядрышка по электростатическому механизму. Т. е. совпадение NLS и NoLS связано с тем, что только NLS требует определенной последовательности аминокислотных остатков, для NoLS важен лишь заряд последовательности. Это приводит к возможности функционирования любого заряженного участка белка (включая NLS Tat-белка и GAR-домен фибрillарина) в качестве NoLS.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской научного фонда (проект 17-75-20199).

#### ЛОКАЛИЗАЦИЯ НЕКОТОРЫХ ЯДРЫШКОВЫХ БЕЛКОВ В «НЕКАНОНИЧЕСКИХ» ЯДРЫШКАХ ИНФУЗОРИИ *DIDINIUM NASUTUM*. © О. Г. Леонова,<sup>1</sup> Б. П. Караджян,<sup>2</sup> Ю. Ф. Ивлев,<sup>3</sup> С. О. Скарлато,<sup>2</sup> В. И. Попенко.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, <sup>2</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и <sup>3</sup>Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН, Москва, popenko@eimb.ru

Интерфазное ядрышко — наиболее крупная структура интерхроматинового домена ядра эукариотической клетки, которая формируется вокруг кластеров рибосомных генов, или ядрышковых организаторов. На ультраструктурном уровне в функциональных ядрышках высших эукариот выявляются три основных компонента — фибрillарные центры (ФЦ), плотный фибрillарный компонент (ПФК) и гранулярный компонент (ГК). В инфузориях ядрышки располагаются в макронуклеусах — транскрипционноактивных соматических полиплоидных ядрах — и имеют разнообразную морфологию. В определенной степени это может быть связано с особенностями организации генома макронуклеуса, который в отличие от генома высших эукариот представлен набором относительно коротких молекул ДНК (в видах с генным размером от 5 до 20 т. п. н., а с субхромосомным размером генома — до нескольких сотен т. п. н.).

Электронно-микроскопические данные показывают, что в инфузории *Didinium nasutum* (субхромосомный размер ДНК) на стадии экспоненциального роста культуры ядрышки имеют инвертированное (по сравнению с «классическими» ядрышками высших эукариот) расположение компонентов: фибрillарный материал обычно образует сгустки — трабекулы — на периферии ядрышка, а середина заполнена гранулярным материалом.

В данной работе с помощью конфокальной микроскопии и специфических антител в ядрышках *D. nasutum* была исследована локализация трех ядрышковых белков: аргентофильных белков нуклеолина (C23) и нуклеофоз-

мина (B23 и NPM1), а также фибрилларина — одного из эволюционно-консервативных белков, гомологи которого присутствуют в клетках разных видов от архебактерий до человека. У высших эукариот фибрилларин участвует в метилировании и процессинге пре-рРНК и располагается в ПФК ядрышка. NPM1 является одним из основных белков ГК ядрышек, хотя в значительном количестве он присутствует в ядре, а в следовых — в цитоплазме. Нуклеолин — многофункциональный белок, который локализуется в основном в ПФК и в меньшей степени в ГК ядрышек.

Результаты наших исследований показали, что в ядрышках *D. nasutum* фибрилларин располагается по периферии инвертированных ядрышек, в области фибриллярного компонента. При использовании антител к нуклеолину равномерно интенсивно окрашивалась область расположения фибриллярного компонента и в некоторых случаях — центральная часть ядрышка. Нуклеофозмин окрашивал центральную часть инвертированных ядрышек, соответствующую гранулярному материалу, но не зону фибриллярного компонента.

Полученные результаты хорошо соответствуют данным трехмерной реконструкции на основе серийных электронно-микроскопических срезов, которая показала, что ядрышки *D. nasutum* представляют собой сложные структуры: фибриллярный компонент в пространстве макронуклеуса образует сеть, внутри которой расположен гранулярный компонент, а хроматиновые тельца, которые могут выполнять роль ядрышковых организаторов, располагаются снаружи ядрышковых сетей, по периферии фибриллярного компонента. В таких ядрышках вектор процессинга рРНК направлен не так, как в «классических» ядрышках высших эукариот, а извне, от периферии ядрышка к его центру, где расположен гранулярный компонент.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-04-06449а).

**УЧАСТИЕ ЯДЕРНОГО РЕЦЕПТОРА NR4A3 В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА.** © Т. С. Леонова, А. А. Дакс, О. Ю. Шувалов, Е. А. Васильева, А. В. Петухов, Н. А. Барлев, О. А. Федорова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Ядерные рецепторы представляют собой большую группу белковых транскрипционных факторов, которые являются генами раннего ответа на широкий спектр сигналов, включающих в себя пептидные гормоны, ростовые факторы, цитокины, жирные кислоты, нейротрансмиттеры, стресс и физические стимулы. Представители подгруппы NR4A (NR4A1, NR4A2 и NR4A3) относятся к орфанным ядерным рецепторам, для которых не обнаружено эндогенных лигандов. Транскрипционная активность и генетические мишени представителей подсемейства NR4A определяются локализацией внутри клетки, уровнем экспрессии генов, кодирующих эти рецепторы, посттрансляционными модификациями и белок-белковыми взаимодействиями. Различные исследования показали, что рецепторы NR4A1—3 играют существенную роль в регуляции метаболизма. В печени и скелетных мышцах NR4A увеличивают экспрессию генов, продукты которых участвуют в транспорте и метаболизме глюкозы. Кроме

того, было показано, что рецепторы NR4A являются модуляторами липидного метаболизма в жировой ткани.

В данной работе мы оценили влияние ядерного рецептора NR4A3 на экспрессию генов, кодирующих некоторые ферменты, изменение уровня которых часто регистрируется в раковых клетках: *ALDOA* (альдолаза А), *ENO1* (енолаза 1), *HCK2* (гексокиназа 2), *LDHA* (L-лактатдегидрогеназа), *MTHFD2* (метилентетрагидрофолат дегидрогеназа 2) и *SHMT2* (серин-гидроксиметил-трансфераза 2), *SLC2A1* (переносчик глюкозы GLUT 1).

Для оценки экспрессии вышеупомянутых генов в качестве матрицы для проведения ПЦР в реальном времени использовали кДНК клеток рака молочной железы MDA-MB-231 через 24 ч после трансфекции плазмидой, содержащей последовательность гена NR4A3, и контрольной плазмидой без вставки соответствующего гена. С помощью ПЦР в реальном времени с использованием праймеров, специфичных для кодирующих последовательностей генов *ALDOA*, *ENO1*, *HCK2*, *LDHA*, *MTHFD2*, *SHMT2* и *SLC2A1*, а также праймеров, специфичных для кодирующей последовательности референсного гена *GAPDH*, оценили уровень относительной экспрессии перечисленных генов. Нормализацию проводили относительно экспрессии *GAPDH* с помощью метода  $\Delta\Delta$ -Ст.

Анализ влияния повышенного уровня NR4A3 на экспрессию генов, кодирующих ферменты метаболических путей, показал, что NR4A3 способствует повышению экспрессии генов, кодирующих лактатдегидрогеназу А (LDHA) и метилентетрагидрофолат дегидрогеназу (MTHFD2). Лактатдегидрогеназа А является ключевым ферментом анаэробного метаболизма. NADP-зависимый митохондриальный фермент MTHFD2 участвует в одноуглеродном метаболизме, который служит поставщиком одноуглеродных фрагментов для биосинтетических путей, в том числе для синтеза пуринов и тимицина. Показано, что увеличение уровня LDHA или MTHFD2 способствует пролиферации раковых клеток и регистрируется в подавляющем большинстве раковых опухолей. Таким образом, возможно влияние NR4A3 на экспрессию генов, кодирующих ферменты, которые способствуют выживаемости и пролиферации раковых клеток.

Подводя итог, следует отметить, что необходимо дальнейшее изучение функций рецептора NR4A3, который может являться потенциальной фармакологической мишенью для лечения метаболических нарушений и раковых заболеваний.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 16-34-60228 и 16-34-00869 мол\_а).

**БЕСКАДМИЕВЫЕ КВАНТОВЫЕ ТОЧКИ: АНАЛИЗ ФОТОФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И ПОСТУПЛЕНИЯ В КУЛЬТИВИРУЕМЫЕ КЛЕТКИ.** © И. К. Литвинов,<sup>1,2,\*</sup> Т. Н. Беляева,<sup>1</sup> А. В. Соловьева,<sup>1</sup> Н. Д. Аксенов,<sup>1</sup> Е. А. Леонтьева,<sup>1</sup> А. О. Орлова,<sup>2</sup> Е. С. Корнилова.<sup>1-4</sup> <sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, <sup>2</sup> Университет ИТМО, Санкт-Петербург, <sup>3</sup> С.-Петербургский политехнический университет Петра Великого и <sup>4</sup> С.-Петербургский государственный университет, \*lik314@mail.ru

В настоящее время квантовые точки (КТ) на основе CdSe и CdTe благодаря их широкому диапазону эмиссии в видимом свете, высокому квантовому выходу фотолю-

минесценции и хорошо воспроизводимой технологии синтеза привлекают внимание исследователей. Тем не менее их применение ограничивается из-за того, что существует вероятность утечки металлов из ядер КТ в результате повреждения защитных оболочек как неорганических, например ZnS, так и органических слоев на поверхности КТ. Решение проблем, связанных с возможным токсическим действием кадмия, основывается на применении бескадмийевых КТ, имеющих в качестве ядра, например, фосфид индия InP. Хотя InP-КТ обладают всеми свойствами, присущими CdSe-КТ, в настоящее время существует очень мало работ по применению этих частиц в биологии. В этом исследовании был проведен сравнительный анализ спектрально-люминесцентных свойств КТ трех видов (CdSe/ZnS КТ-ПЭГ, InP/ZnS КТ-ПЭГ-NH<sub>2</sub> и КТ-ПЭГ-COOH) в буферных растворах при pH 7.4 и 4.0, который показал, что при низком значении pH интенсивность фотolumинесценции снижается на 74, 52 и 19 % соответственно. Установлено, что после попадания в биологическое окружение, при поглощении макрофагами J774 спектры флуоресценции КТ не меняются по сравнению с флуоресценцией КТ в растворе. Также было изучено влияние функциональных групп —COOH и —NH<sub>2</sub> на поверхности InP КТ-ПЭГ на эффективность проникновения в клетки макрофагов J774 и клетки HeLa, а также оценена их цитотоксичность с помощью конфокальной микроскопии и проточной цитометрии. Обнаружено, что КТ, несущие отрицательно заряженные группы —COOH, увеличивают флуоресценцию клеточной популяции макрофагов на 179, а HeLa — на 55 %, тогда как КТ, несущие аминогруппы, увеличивают флуоресценцию популяции на 46 и 21 % соответственно. По данным конфокальной микроскопии и проточной цитометрии можно сделать вывод о том, что КТ-ПЭГ-COOH проникают в клетки в большей степени, чем КТ, несущие NH<sub>2</sub>-группы, однако принимая во внимание тот факт, что падение флуоресценции КТ-ПЭГ-NH<sub>2</sub> и КТ-ПЭГ-COOH при низких значениях pH различается почти в 3 раза, необходимы дополнительные исследования для корректной количественной оценки поглощения этихnanoструктур клетками. В серии экспериментов было изучено влияние инкубации CdSe- и InP-КТ в концентрациях 20 и 60 нМ в течение 24 ч на выживаемость клеток. Оценка цитотоксичности проведена на клетках HeLa с помощью цитометрического анализа с использованием иодида пропидия (PI). Показано, что через 24 ч после добавления КТ в питательную среду независимо от состава ядра и использованных концентраций КТ жизнеспособность клеток составила более 90 % (менее 10 % клеток были окрашены PI). Продемонстрировано, что InP КТ являются эффективным инструментом для биологических исследований.

**ПЕРОРАЛЬНОЕ ВВЕДЕНИЕ ЭССЕНЦИАЛЬНЫХ ФОСФОЛИПИДОВ ВЛИЯЕТ НА СТРУКТУРУ ЦИТОСКЕЛЕТА СПЕРМАТОЗОИДОВ И КЛЕТОК СЕМЕННИКОВ МЫШЕЙ В УСЛОВИЯХ ДЛЯ ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКИ.** © С. С. Локтев,<sup>1</sup> М. А. Усик,<sup>1,2</sup> И. В. Огнева.<sup>1,2</sup> <sup>1</sup> Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, и <sup>2</sup> Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова (Сеченовский университет), iogneva@yandex.ru

Изменение внешнего механического поля приводит к реорганизации цитоскелета и формированию его адап-

ционного патера у различных типов клеток — как соматических, так и половых. Однако механизм запуска подобных изменений, так же как и пути его регуляции, до сих пор остаются малопонятными. Целью данной работы было исследование содержания цитоскелетных белков и мРНК кодирующих их генов в сперматозоидах и клетках семенников мышей, которые подвергались длительному 30-суточному антиортостатическому вывешиванию для моделирования гравитационной разгрузки и получали эссенциальные фосфолипиды в дозировке 500 мг/кг/сут (группа 30HSE) или аналогичную дозу плацебо (группа 30HS). Соответственно были сформированы контрольные группы (группа СЕ и группа С). Относительное содержание изоформ актина (бета-, гамма-) и альфа-актининов (1 и 4) оставалось на одном уровне во всех группах исследования в сперматозоидах. В клетках семенников относительное содержание изоформ актина было на одном уровне, так же как и в сперматозоидах. Однако в клетках семенников содержание ACTN1 в группе 30HS было достоверно выше, чем в группе С на 17 % ( $p < 0.05$ ). Напротив, содержание ACTN4 в группе 30HS было ниже контроля на 20 % ( $p < 0.05$ ). При этом в группе с применением эссенциальных фосфолипидов относительное содержание ACTN1 и ACTN4 не отличалось от контроля. Относительное содержание бета-тубулина в контрольной группе С и контрольной группе с применением эссенциальных фосфолипидов СЕ было сходным. В группе после 30-суточного вывешивания 30HS оно было снижено на 19 % ( $p < 0.05$ ), так же как и в группе с применением эссенциальных фосфолипидов 30HSE (на 27 %,  $p < 0.05$ ). В тканях семенников относительное содержание тубулина не менялось ни в одной из экспериментальных групп. Относительное содержание мРНК бета-актина и гамма-актина оставалось на одном уровне в сперматозоидах и в тканях семенников во всех группах исследования. Содержание мРНК Actn1 в сперматозоидах группы 30HS было выше на 47 % ( $p < 0.05$ ) относительно группы С. В сперматозоидах групп СЕ и 30HSE содержание мРНК Actn1 между собой достоверно не различалось, но было выше, чем в группе С, на 39 и 41 % ( $p < 0.05$ ) соответственно. В тканях семенников в группе 30HS содержание мРНК Actn1 было выше, чем в контроле, на 194 % ( $p < 0.05$ ). Аналогично сперматозоидам в тканях семенников групп СЕ и 30HSE содержание мРНК Actn1 между собой достоверно не различалось, но было выше, чем в группе С, на 94 и 89 % ( $p < 0.05$ ) соответственно. Относительное содержание мРНК Actn4 в сперматозоидах и тканях семенников группы 30HS не отличалось от группы С. В сперматозоидах групп СЕ и 30HSE содержание мРНК Actn4 было на уровне группы С; в тканях семенников групп СЕ и 30HSE оно было выше, чем в группе С, на 38 и 36 % ( $p < 0.05$ ) соответственно. Относительное содержание мРНК бета-тубулина (Tubb2b) было ниже контрольного уровня в сперматозоидах групп вывешивания: в группе 30HS — на 52 %, 30HSE — на 49 % ( $p < 0.05$ ). При этом в тканях семенников изменений не наблюдалось.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований Института медико-биологических проблем РАН и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

RelA/p65 УСИЛИВАЕТ БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ACTN4 В КЛЕТКАХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО

**РАКА ЛЕГКОГО.** © Е. В. Ломерт,<sup>1</sup> Л. В. Туроверова,<sup>1</sup> Д. В. Кригер,<sup>1</sup> А. Г. Миттенберг,<sup>1</sup> Н. Д. Аксенов,<sup>1</sup> Н. В. Панюшев,<sup>1</sup> М. Г. Хотин,<sup>1</sup> К. В. Волков,<sup>2</sup> Н. А. Барлев,<sup>1</sup> Д. Г. Тентлер.<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и <sup>2</sup> Исследовательский ресурсный центр «Молекулярные и клеточные технологии» С.-Петербургского государственного университета, *dtentler@incras.ru*

Альфа-актинин 4 (ACTN4) является актинсвязывающим белком спектринового суперсемейства. ACTN4 встречается как в цитоплазме, так и в ядре эукариотических клеток. Основной функцией цитоплазматического ACTN4 являются стабилизация актиновых филаментов и их связывание с фокальными контактами. Ядерный ACTN4 участвует в регуляции экспрессии генов после активации определенных транскрипционных факторов, но механизмы регуляции не полностью ясны. В наших предыдущих исследованиях было показано взаимодействие ACTN4 с субъединицей RelA/p65 фактора NF-кappaB и влияние на его транскрипционную активность в клетках A431 и HEK293. В настоящей работе мы исследовали изменения в составе ядерных ACTN4-взаимодействующих белков в клетках немелкоклеточного рака легкого H1299 при стабильной избыточной экспрессии RELA. Мы показали, что ACTN4 присутствует в ядрах клеток H1299 независимо от уровня экспрессии RELA. Интересно, что стабильная эктопическая экспрессия RELA в этих клетках подавляет пролиферацию клеток, но не оказывает существенного влияния на клеточный цикл. Сравнительный анализ иммунопреципитатов ACTN4 двухмерным электрофорезом с последующей масс-спектрометрией показал, что hnRNP A2/B1, hnRNP H1 и HSP7C взаимодействуют с ACTN4 в ядрах клеток H1299. При длительной эктопической экспрессии RELA в клетках H1299 количество белков, взаимодействующих с ядерным ACTN4, увеличивается, что привело к дополнительной идентификации hnRNP K, EF1A1 и ACTG. Кроме того, биоинформационный анализ экспрессии генов у пациентов с раком легких показал, что совместная экспрессия ACTN4 и RELA коррелирует с плохим прогнозом выживания. Мы предполагаем, что влияние RELA на пролиферацию клеток H1299 может быть опосредовано ACTN4 и взаимодействующими с ним белками.

**РЕКОМБИНАНТНЫЙ БЕЛОК НА ОСНОВЕ С-КОНЦЕВОГО УЧАСТКА БЕЛКА PI31 ИНГИБИРУЕТ ПРОТЕАСОМ IN VITRO.** © Е. А. Малкина,<sup>1,2</sup> Е. Е. Дьяконов,<sup>2,3</sup> А. Н. Томилин,<sup>1–3</sup> А. С. Цимоха.<sup>2</sup> <sup>1</sup> Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена, Санкт-Петербург, <sup>2</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и <sup>3</sup> С.-Петербургский государственный университет, *elizavetavolck@gmail.ru*

Протеасома — мультисубъединичный белковый комплекс, который отвечает за избирательную деградацию белков в клетке. Помимо клетки протеасомы обнаружены также и во внеклеточном пространстве. Функции внеклеточных протеасом неизвестны. Использование специфического ингибиования внеклеточных протеасом *in vitro* поможет понять роль протеасом во внеклеточном пространстве. Современные ингибиторы протеасом можно условно поделить на 2 группы — химические и белковые. В настоящей работе мы использовали протеасомный ин-

гибитор PI31, потому что белковый ингибитор не должен проникать внутрь клетки, что крайне важно в нашем исследовании. Белок PI31 имеет мол. массу 29.7 кДа (271 а. к.) и ингибирует гидролиз небольших синтетических субстратов и крупных развернутых белков протеасомой.

Показано, что ингибирующая активность белка PI31 локализована на богатом пролином С-концевом участке длиной 123 а. к. На основе этого участка мы создали рекомбинантный белок mcPI31 — несущий на С-конце полипептид, используемый для аффинной очистки. В состав полипептида входит сайт для расщепления TEV-протеазой и последовательность из шести гистидинов. Последовательность mcPI31 была клонирована в специальный экспрессионный вектор pET-24 d (+). Рекомбинантный белок mcPI31 был экспрессирован в бактериях *E. coli* и аффинно очищен с помощью хелатного Ni<sup>2+</sup>-носителя. Далее мы провели оценку влияния различных концентраций mcPI31 на ингибицию протеолитической активности протеасом с помощью специфических флуорогенных пептидов. Протеасомы были аффинно очищены из клеток человека линии K562. В качестве положительного контроля мы использовали специфический ингибитор протеасом MG132 с концентрацией 1 мкМ. Мы показали, что ингибирующая активность mcPI31 проявляется уже при концентрации 0.5 мкМ и при достижении концентрации mcPI31 1 мкМ эффективность ингибиции протеасом достигает аналогичной, как для ингибитора MG132.

Таким образом, мы показали, что рекомбинантный белок mcPI31 способен эффективно ингибировать протеолитическую активность протеасом *in vitro*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской научного фонда (проект 16-14-10343).

**ЛОКАЛИЗАЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ ПЕПТИДОВ CLE В ОПУХОЛЯХ РЕДИСА *RAPHANUS SATIVUS* L.** © Ю. В. Маловичко, А. А. Ткаченко, И. Е. Додуева, Л. А. Лутова. Кафедра генетики и биотехнологии биологического факультета С.-Петербургского государственного университета.

Рост и органогенез растений осуществляются при участии особых пролиферативных тканей, или меристем. При эктопической пролиферативной активности клеток формируются так называемые нерегулярные меристемы, дающие начало таким морфологическим образованиям, как раневые и эмбриогенные каллусы, опухоли и галлы. В отличие от галлов и каллусов, формирующихся у многих растений при поранении или инфекции патогенами, формирование опухолей в естественных условиях было показано для сравнительно небольшого количества видов, включая представителей родов *Nicotiana* (табак), *Raphanus* (редька/редис), *Arabidopsis*, *Bryophyllum* и т. д.

Наша научная группа исследует различные аспекты образования опухолей у инбрэдных линий редиса, включая участие в данном процессе сигнальной системы WOX-CLE. На данный момент в опухолях была обнаружена экспрессия ряда генов *CLE*, включая *RsCLE1*, 2, 11, 13, 16, 19 и 41 (Gancheva et al., 2016 BMC Plant Biol. 16 (Suppl 1): 7). В данной работе мы планируем выявить конкретную роль пептидов CLE в морфо- и гистогенезе опухолей редиса путем локализации некоторых их рецеп-

торов, а именно CRN, CLV2 и PXY. Экспрессия генов данных рецепторов и их лигандов в опухолях была показана путем ОТ-ПЦР и транскриптомного анализа. Для локализации рецепторов мы сконструировали плазмиды, содержащие кодирующие последовательности соответствующих генов и репортерного гена *GFP* под контролем промоторов, клонированных из генома *Arabidopsis*. Растения двух линий редиса (опухолеобразующей и контрольной) были трансформированы с помощью *Agrobacterium rhizogenes*. Эффективность трансформации была подтверждена анализом срезов бородатых корней на конфокальном флуоресцентном микроскопе. Аналогичным образом планируется локализовать рецепторы в естественных опухолях. Мы также планируем визуализировать домены экспрессии данных генов при помощи репортерных конструкций с кодирующей последовательностью гена *GUS*, а также провести аналогичную работу с рядом других нерегулярных меристем, включая опухоли, индуцированные гормонами и патогенами.

Работа осуществляется при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 16-16-10011).

**ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ СТРОМАЛЬНЫХ ПРОГЕНИТОРОВ КОСТНОГО МОЗГА ГРЫЗУНОВ В УСЛОВИЯХ РЕАЛЬНОЙ И МОДЕЛИРУЕМОЙ МИКРОГРАВИТАЦИИ.** © Е. А. Маркина, И. В. Андрианова, Е. Р. Андреева, Л. Б. Буравкова. Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, goncharova-tim@list.ru

В настоящее время основной задачей биологических экспериментов в космических полетах является изучение фундаментальных механизмов адаптации земных организмов к воздействию микрогравитации на различных уровнях организации — клеточном, тканевом и органном. Как известно, костный мозг представляет собой дело прогениторных клеток мезенхимного происхождения, функционирование которых обеспечивает физиологический гемопоэз и гомеостаз костной ткани. Значительный вклад в понимание процессов, происходящих в костном мозге в условиях невесомости, вносят биологические эксперименты, которые проводятся на беспилотных летательных аппаратах (биоспутниках) и наземном моделировании эффектов микрогравитации. Несмотря на большой объем накопленных данных, многие вопросы, связанные с потенциалом малодифференцированных стромальных прогениторов костного мозга, остаются открытыми. Целью исследования было изучение состояния компартимента прогениторных клеток костного мозга грызунов в условиях реальной и моделируемой микрогравитации.

Для этого были исследованы следующие морфологические показатели: клеточность костного мозга, клоненная активность стромальных предшественников, пролиферативная активность и дифференцировочные потенции стромальных прогениторов костного мозга грызунов.

Исследование проводили на самцах мышей линии C57Bl/6N после 30-суточного полета биоспутника и 30-суточного антиортостатического вывешивания и на самцах крыс линии Wistar после 30-суточного антиортостатического вывешивания.

Подсчет проводили после выделения клеток. Пролиферативную активность клеток определяли по числу удвоений популяций (PD). Для характеристики малодифференцированных стромальных клеток анализировали

число КОЕ-ф и способность к адипо- и остеодифференцировке.

Анализ полученных результатов позволяет сделать вывод о том, что факторы длительного космического полета не повлияли на клеточность, клоногенную и пролиферативную активность, спонтанный дифференцировочный остео- и адипопотенциал стромальных предшественников костного мозга мышей C57Bl/6N при увеличении эффективности адгезии этих клеток *in vitro*. В условиях 30-суточного вывешивания произошло снижение клоногенной и пролиферативной активности стромальных предшественников костного мозга мышей C57Bl/6N. При моделировании эффектов микрогравитации клеточность и пролиферативная активность клеток костного мозга крыс несколько увеличились, число КОЕ-ф и площадь, занимаемая колониями, снижались.

Таким образом, изменения, выявленные после космического полета, носят умеренный обратимый характер, что свидетельствует о сохранности потенций ранних стромальных предшественников костного мозга. Моделирование эффектов микрогравитации приводит к значительному изменению функциональной активности стромальных прогениторных клеток костного мозга грызунов, которое также является обратимым.

Работа выполнена в рамках программы фундаментальных исследований Института медико-биологических проблем РАН и при частичной финансовой поддержке программы «Ведущие научные школы».

**РОЛЬ МОЧЕВИНЫ И ГЛИЦИНА КАК ИСТОЧНИКОВ АЗОТА И УГЛЕРОДА ДЛЯ ДИНОФЛАГЕЛЛЯТ.** © О. В. Матанцева. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, matantseva@incras.ru

Мочевина и аминокислоты являются самыми распространенными растворенными органическими соединениями в прибрежных водах Мирового океана. Многие фотографные динофлагелляты могут использовать их в качестве источников азота наряду с «классическими» неорганическими субстратами. Однако до сих пор остается неясным, используют ли эти микроорганизмы и углерод органических веществ. С помощью мечения субстратов стабильными изотопами и масс-спектрометрии мы исследовали конкурентное поглощение нитрата и мочевины, а также нитрата и глицина культурами динофлагеллят *Prorocentrum minimum* на уровне популяций и отдельных клеток. В экспериментах скорость поглощения мочевины и глицина значительно превышала скорость поглощения нитрата, а мочевина оказывала ингибирующее влияние на конкурентную ассимиляцию нитрата. При этом скорость поглощения субстратов, а также выраженность подавления ассимиляции нитрата в присутствии мочевины значительно различались у отдельных клеток динофлагеллят. Как мочевина, так и глицин преимущественно использовались динофлагеллятами в качестве источников азота. Потребление углерода органических веществ было в 14—20 раз меньше теоретически ожидаемого (в соответствии со структурой молекул мочевины и глицина) и составляло всего 1—2 % от уровня поглощения неорганического углерода. С помощью методов биоинформатики в транскриптоме *P. minimum* из базы данных MMETSP были определены белки, вовлеченные в метаболизм мочевины и глицина. Наблюданное разобщение

ние ассимиляции азота и углерода органических веществ может быть объяснено метаболическими превращениями мочевины и глицина в процессе их ассимиляции клетками. Такое разобщение может понижать общую эффективность поглощения неорганического углерода, необходимого для фотосинтеза, поскольку потребление азота мочевины и глицина ведет к высвобождению неорганического углерода. Обнаруженная физиологическая вариабельность клеток *P. minimum* в отношении поглощения и ассимиляции питательных субстратов, вероятно, оказывает значительное влияние на динамику популяций динофлагеллят и их цветений в естественных экосистемах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской научного фонда (проект 16-14-10116).

#### РАЗНООБРАЗИЕ ОРГАНИЗАЦИИ ЯДРЫШКОВОГО МАТЕРИАЛА АМЕБ СЕМЕЙСТВА THECAMOEVIDAE (АМОЕВОЗОА: DISCOSEA). © Е. С. Мезенцев. С.-Петербургский государственный университет.

Лобозные амебы семейства *Thecamoebidae* широко распространены в морских, пресноводных и наземных местообитаниях. Во второй половине XX в. текамебиды были объектом активного изучения, однако до сих пор большинство представителей рода текамеба описано только на светомикроскопическом уровне. Возможно, это обусловлено тем, что семейство *Thecamoebidae* — одно из немногих (если не единственное) семейство амеб, представители которого во многих случаях могут быть определены до вида на светомикроскопическом уровне, что особенно характерно для центрального рода *Thecamoeba*.

В ходе наших исследований в высеах проб из природных местообитаний на wMY-агар были обнаружены амебы, принадлежащие роду *Thecamoeba*. Было выделено 33 штамма текамебид, представляющих 10 различных видов. Некоторые штаммы текамеб можно определить как известные виды (*Thecamoeba aesculea*, *T. similis* и *T. quadrilineata*), однако несколько штаммов, вероятно, являются новыми для науки видами. 2 штамма относятся к роду *Sappinia*, что подтверждено молекулярными данными.

Амебы штаммов Ta2, Ta4, Ta10, Ta24, Ta 64, Ta75 и Ta78 обладают единственным ядром, в интерфазе содержащим единственное центрально расположенное ядрышко. Ядрышко может содержать лакуны. Амебы этих штаммов по морфологическим признакам были идентифицированы как виды *T. quadrilineata* и *T. aesculea*. Штаммы Ta43, Ta61 и Ta73 представлены амебами, также имеющими везикулярное ядро. Однако у представителей этих штаммов ядрышко часто несет заметные неровности, и многие клетки в культурах обладают гетерогенным на светомикроскопическом уровне ядрышком. Совокупность морфологических характеристик не соответствует ни одному из описанных видов текамеб. Часть клеток в штаммах Ta74 и Ta81 имеют ядро, в котором располагается вытянутое веретеновидное неровное ядрышко, расположенное поперек ядра. Остальные клетки в культуре обладают обычным везикулярным ядром с шаровидным ядрышком, иногда несущим лакуны.

Многие культуры содержат амеб с расположенным по периферии ядра ядрышковым материалом, при этом его организация сильно варьирует у представителей разных штаммов. Для штаммов Ta77 и Ta79 характерны аме-

бы, несущие в вытянутом ядре от 3 до 5 уплощенных ядрышек, прилегающих к стенке ядра. Такая же морфология ядра совпадает с таковой у *T. striata*. Ядра представителей штамма Ta34 содержат на периферии около двух десятков линзовидных ядрышек, расстояние между которыми чуть меньше диаметра самих ядрышек. Амебы штамма Ta65 обладают небольшими округлыми ядрышками, количество которых варьирует около полутора десятков и которые располагаются как у стенок ядра, так и в толще него. Множество мелких округлых или вытянутых ядрышек, часто с неровным краем и лакунами, характерно для представителей штаммов Ta66, Ta68, Ta69, Ta70 и Ta72. У этих штаммов ядрышки в основном прилегают к стенке ядра, однако встречаются отдельные ядрышки, расположенные в толще кариоплазмы. У представителей штамма Ta55 ядрышковый материал организован в виде сети, расположенной по периферии ядра. Организация ядрышкового материала в виде объемной трехмерной сети, состоящей из округлых участков, иногда несущих лакуны, и перемычек между ними, характерна для амеб из штамма Ta37.

Необходимо отметить, что организация ядрышкового материала среди представителей рода *Thecamoeba* не коррелирует с морфотипами текамеб. При филогенетическом анализе прослеживается тенденция разделения рода на две монофилетические группы, в состав одной из которых входят амебы, имеющие везикулярное ядро. Представители второй группы обладают ядром, содержащим периферически расположенные многочисленные ядрышки. Причины такого разделения, а также различия в биологии амеб с различной формой и количеством ядрышек пока остаются неясными. Выявленные нами разнообразие и стабильность организации ядрышкового материала в интерфазных ядрах текамеб показывают, что этот признак может быть использован в качестве одного из основных при описании и идентификации видов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской научного фонда (проект 17-14-01391).

#### РОЛЬ СТРЕТЧАКТИВИРУЕМЫХ КАНАЛОВ В АНАБОЛИЧЕСКОМ ОТВЕТЕ ИЗОЛИРОВАННОЙ КАМБАЛОВИДНОЙ МЫШЦЫ КРЫСЫ НА СЕРИЮ ЭКСЦЕНТРИЧЕСКИХ СОКРАЩЕНИЙ ПОСЛЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКИ. © Т. М. Мирзоев, С. А. Тыганов, Б. С. Шенкман. Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, tmirzoev@yandex.ru

В скелетной мышце сигнальный путь mTORC1/p70S6k является ключевым анаболическим путем, который активируется в ответ на механические стимулы. При этом стrectчактивируемые ионные каналы (stretch-activated channels, SAC) могут играть важнейшую роль в восприятии мышечным волокном внешнего механического сигнала. Однако молекулярные механизмы анаболической реализации внешнего механического сигнала в мышечном волокне на фоне функциональной разгрузки изучены недостаточно. В связи с этим цель исследования состояла в выявлении роли SAC в проведении механического сигнала к анаболическому пути mTORC1/p70S6k в *m. soleus* крысы после 7-суточной функциональной разгрузки. Функциональная разгрузка мышц задних конечностей осуществлялась методом антиортостатического вывешивания (hindlimb suspension, HS). Крысы Wistar

были разделены на 5 групп: «Контроль», «1-HS» (вывешивание в течение 1 сут), «3-HS» (3-суточное вывешивание) и «7-HS» (7-суточное вывешивание), «7HS + GdCl<sub>3</sub>» (7-суточное вывешивание с последующим ингибицией SAC). После окончания вывешивания изолированные камбаловидные мышцы крыс были подвергнуты серии эксцентрических сокращений *ex vivo*. Скорость синтеза белка оценивали методом SU<sub>n</sub>SET. Методом Вестерн-блотинга было определено содержание фосфорилированных форм маркера mTORC1 — рибосомальной киназы p70S6k. Было обнаружено, что степень фосфорилирования p70S6k и прирост синтеза белка в *m. soleus* крысы были значительно меньше после 3- и 7-суточной функциональной разгрузки по сравнению с контрольными значениями. Динамика прироста уровня фосфорилирования p70S6k после ЭС по мере увеличения длительности разгрузки была похожа на аналогичную динамику прироста синтеза белка. Для выявления роли стrectчактивируемых каналов в передаче механического сигнала использовали ингибитор SAC GdCl<sub>3</sub> (20 мкМ), который добавлялся в среду с изолированной *m. soleus* после периода 7-суточной разгрузки. Было обнаружено одинаковое снижение фосфорилирования p70S6k, рибосомального белка S6 и 4E-BP1 относительно контроля как в группе «чистого» вывешивания, так и в группе с блокатором SAC.

Таким образом, механическая стимуляция камбаловидной мышцы крысы *ex vivo* после функциональной разгрузки привела к снижению прироста синтеза белка, что могло быть связано с инактивацией стrectчактивируемых каналов и пониженной активацией сигнального пути mTORC1-p70S6k.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-34-60055 мол\_а\_дк).

**СНИЖЕНИЕ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ХОДЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НЕ ВЛИЯЕТ НА ИХ МИГРАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА.** © Н. Михеева,<sup>1</sup> П. Бутылин,<sup>2</sup> Б. Попов.<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и<sup>2</sup> Федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, borisvp478@gmail.com

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) сегодня рассматриваются как естественная система reparации тканей благодаря их способности к продолжительной пролиферации и миграции в место повреждения, в котором клетки выделяют ростовые факторы, изменяющие тканевое микроокружение и способствующие заживлению раны. В контексте восстановительной терапии, пролиферация и миграция МСК представляют собой функциональные свойства, взаимосвязь которых в настоящее время остается неизученной. Цель настоящей работы заключалась в изучении зависимости миграционных и пролиферативных свойств МСК человека в ходе пассирования в культуре. С этой целью мы оценивали в процессе культивирования МСК 5-го и 10-го пассажей изменение их пролиферативных, миграционных свойств и экспрессии соответствующих маркеров. МСК, полученные из менструальной крови (эМСК), жировой ткани (жМСК) и костного мозга (кмМСК) человека, тестировали в ходе

культивирования в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C и 100 % влажности. Пролиферативную активность МСК оценивали путем определения времени удвоения и экспрессии маркеров Ki67 и циклина D1 с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (OT-ПЦР), а миграционную способность — путем оценки миграции клеток через фильтры 8 мкм и способности регенерировать место повреждения *in vitro* с помощью техники «зарастания царапины». В качестве контроля были использованы клетки установленных эпителиальных линий различной тканевой специфичности — кишечной карциномы НСТ116, карциномы молочной железы MCF7 и карциномы легких А-549. Мы обнаружили, что в ходе культивирования МСК различного тканевого происхождения скорость их пролиферации уменьшается в 2 раза, что соответствует уменьшению экспрессии Ki-67 и в некоторых линиях циклина D1. Миграционная подвижность МСК в 2 раза превосходит таковую клеток эпителиальных линий и в ходе пассирования от 5-го до 10-го пассажа не изменяется. Высокая миграционная подвижность МСК находится в прямом соответствии с уровнем экспрессии эффекторных мезенхимных маркеров (виментина и N-кадхерина) и отсутствием экспрессии E-кадхерина, которые не изменяются при продолжительном культивировании. Полученные данные показывают, что в ходе продолжительного пассирования пролиферативная активность эМСК значительно снижается, а их миграционная способность не изменяется, и это свидетельствует о том, что механизмы контроля пролиферации и миграции МСК различны и разобщены. Потенциальными участниками механизма контроля миграции являются транскриptionные факторы Snail1,2, характеризующиеся высоким и стабильным уровнем экспрессии в клетках мезенхимных линий по сравнению с таковыми в эпителиальных линиях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-04-00251).

**ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ FoxO3 MuRF1 и MAFbx В СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ НА РАННИХ СРОКАХ РАЗГРУЗКИ.** © Е. П. Мочалова,<sup>1,2,\*</sup> С. П. Белова,<sup>1,2</sup> Н. А. Вильчинская,<sup>2</sup> Т. Л. Немировская,<sup>1,2</sup> Б. С. Шенкман.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова и

<sup>2</sup> Институт медико-биологических проблем РАН, Москва \*mochalova\_ekaterina@lenta.ru

Функциональная разгрузка постуральных мышц приводит к их прогрессирующей атрофии. Это происходит из-за снижения белкового синтеза и увеличения распада белка (Bodine S. C. 2013. Int. J. Biochem. Cell Biol. 45 : 2200; Bodine S. C., Baehr L. M. 2014. Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 307 : 484). Значительную роль в реализации распада белка играет убиквитин-протеасомная система, ключевыми компонентами которой являются Е3-лигазы. Ранее в нашей лаборатории отмечали пик экспрессии Е3-лигаз MuRF1 и MAFbx на 3-и сут функциональной разгрузки (Shenkman B. S. et al. 2015. Arch. Biochem. Biophys. 15 : 36). Очевидно, что повышение экспрессии Е3-лигаз начинается на более ранних этапах разгрузки (первые часы 1 сут). Мы выявляли транскрип-

ционные факторы, которые могут запускать их экспрессию. Используя модель функциональной разгрузки по методу Ильина—Новикова в модификации Мори—Холтон, мы проанализировали уровень pAkt (S473) и pFoxO3 (S253) — факторов, регулирующих экспрессию E3-лигаз. После вывешивания в течение 1 сут обнаружено снижение pAkt (S473) и pFoxO3 (S253) на 60 и 45 % соответственно ( $P \leq 0.05$ ) относительно контроля, в то время как экспрессия E3-лигаз MuRF1 и MAFbx увеличивалась в 1.4 и 1.9 раза соответственно ( $P \leq 0.05$ ). Одновременно мы обнаружили накопление в ядре гистондеацетилазы II класса HDAC 4 (регулирует содержание транскрипционного фактора E3-лигаз миогенина MYOG) (Moresi V. et al. 2010. Cell. 143 : 35). В группе вывешивания в течение 1 сут наблюдали тенденцию к увеличению уровня мРНК миогенина. Но уже на 3-и сут его экспрессия увеличивалась в 2.5 раза относительно контроля ( $P \leq 0.05$ ). После разгрузки в течение 3 сут экспрессия E3-лигаз MuRF1 и MAFbx возрастала еще больше (в 3.8 и 6.1 раза соответственно,  $P \leq 0.05$ ), а уровень фосфорилирования Akt (S473) и FoxO3 (S253) был по-прежнему снижен (на 70 и 48 % соответственно,  $P \leq 0.05$ ) по сравнению с контролем. Вывод: увеличение экспрессии E3-лигаз MuRF1 и MAFbx происходит уже в 1-е сут разгрузки, регулирует экспрессию транскрипционный фактор FoxO3. Через 3-е сут в процесс дополнительно к FoxO3 включается миогенин.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 17-04-0183).

**ЗАЧЕМ ЯДРО СБЕГАЕТ ИЗ КЛЕТКИ? ЦИТОМИКСИС В МЕЙОЗЕ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ.** © С. Р. Мурсалимов, Е. В. Дейнеко. Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, mursalimovsr@gmail.com

Миграция ядер между растительными клетками (цитомиксис) является загадочным клеточным феноменом, который часто обнаруживается в мужском мейозе высших растений. Цитомиксис привлекает к себе внимание из-за неизвестных клеточных механизмов, обеспечивающих миграцию ядер, а также из-за возможного эволюционного значения этого процесса, поскольку перемещение генетического материала происходит между клетками, формирующими пыльцу. Несмотря на то что цитомиксис был открыт более 100 лет назад, из-за методологических трудностей процесс в его изучении был незначительным. Данные, позволившие по-новому взглянуть на это явление, были получены при анализе мигрирующих ядер с помощью электронной и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии и методов иммуноокрашивания и флуоресцентной гибридизации *in situ*. Используя растения табака в качестве модели, мы смогли показать, что хроматин, мигрирующий между клетками, окружен неповрежденной ядерной оболочкой. Такой хроматин не подвергается гетерохроматизация, и в нем присутствуют нормальные маркеры эухроматина. Степень конденсации мигрирующего хроматина соответствует текущей стадии мейоза, и в нем выявляются нормальные структуры синаптонемного комплекса. В клетках с цитомиксисом не обнаруживаются морфологические и молекулярные маркеры программируемой клеточной гибели. Показано, что у индивидуальных хромосом и геномов (в случае аллопо-

липлоидов) отсутствует предрасположенность к миграции в другую клетку, т. е. части ядра вовлекаются в цитомиксис случайным образом. Полученные данные позволяют предполагать включение цитомиктического хроматина в ядро реципиентной клетки и тем самым подтверждают гипотезу об эволюционном значении цитомиксиса.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 16-34-60007 мол\_а\_дк) и программы СО РАН (проект 0324-2016-0003).

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КЛЕТОК КОЖИ С ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫМИ ПОЛИЛАКТИДНЫМИ ПЛЕНКАМИ.** © Ю. А. Нащекина,<sup>1,\*</sup> Н. М. Юдинцева,<sup>1</sup> П. О. Никонов,<sup>1</sup> И. Л. Самусенко,<sup>2</sup> А. Ю. Билибин,<sup>3</sup> М. И. Блинова.<sup>1,\*</sup> <sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, <sup>2</sup> Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А. М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург, и <sup>3</sup> Институт химии, С.-Петербургский государственный университет, \*ulychka@mail.ru

Перспективным направлением современной клеточной терапии является культивирование клеток на биодеградируемых полимерных носителях с целью дальнейшей трансплантации тканеинженерного продукта в область повреждения. Перспективным материалом для этих целей является полимер на основе молочной кислоты — полилактид. Несмотря на то что носители на основе полилактидов обладают рядом преимуществ, таких как нетоксичность, контролируемая скорость резорбции, достаточная механическая прочность, синтетическая гидрофобная поверхность носителя препятствует адгезии, распластыванию и пролиферации клеток. Модификация полилактидной поверхности и введение модифицирующих функциональных агентов будут увеличивать гидрофильность поверхности и способствовать адгезии и распластыванию клеток. Цель настоящего исследования изучение взаимодействия клеток кожи с функционализируемыми полилактидными пленками и трансплантация их под кожу лабораторных животных.

В качестве модифицирующего агента использовали полиэтиленгликоль и коллаген I типа. В процессе выполнения работы были приготовлены пленки на основе смеси поли(D,L-лактида) и полиэтиленгликоля различной молекулярной массы. Структуру полученных пленок анализировали методами сканирующей электронной микроскопии. На модифицированных пленках культивировали клетки кожи — фибробласты и кератиноциты, оценивали адгезию и организацию актинового цитоскелета. Модифицированные полиэтиленгликолем и коллагеном пленки с выращенным на них пластом кератиноцитов имплантировали под кожу лабораторным животным.

В результате выполнения работы получены пористые пленки с размером пор в диапазоне от 2 до 10 мкм в зависимости от молекулярной массы полиэтиленгликоля и его количества. Токсического действие полиэтиленгликоля на фибробласты и кератиноциты обнаружено не было. Выявлено, что наибольшее количество прикрепившихся и распластанных кератиноцитов и фибробластов было на образцах, модифицированных полиэтиленгликолем с мол. массой 6000 и коллагеном. Показано, что эффективность восстановления ткани после трансплантации кератиноцитов вместе с функционализированными по-

лимерными пленками выше по сравнению с нефункционализированными пленками или только пластом кератиноцитов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068).

JNK/SAPK AND P38MAPK SIGNALING ARE ESSENTIAL FOR EFFICIENT REPROGRAMMING OF HUMAN FIBROBLASTS TO HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS. © I. Neganova, L. Armstrong, M. Lako. Institute of Human Genetics, International Centre for Life, Newcastle University, UK, irina.neganova@ncl.ac.uk

Reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells (iPSCs) holds enormous promise for regenerative medicine. Reprogramming is a stepwise process with well-defined stages of initiation, maturation and stabilisation. The initiation phase is stochastic but nevertheless very important as it sets the gene expression pattern that permits completion of reprogramming; hence a better understanding of this phase and how this is regulated may provide the molecular cues for improving the reprogramming process. c-Jun N-terminal kinase (JNK)/stress-activated protein kinase (SAPKs) are stress activated MAPK kinases that play an essential role in several processes known to be important for successful completion of the initiation phase such as cellular proliferation, mesenchymal to epithelial transition (MET) and cell cycle regulation. We found that key components of the JNK/SAPK signaling pathway increase expression as early as day 3 of the reprogramming process and continue to rise in reprogrammed cells throughout the initiation and maturation stages. Also, p38 MAPK signalling pathway has shown a subpopulation- and phase-specific pattern of activation occurring during the initiation and maturation stage of reprogramming. Using both chemical inhibitors and RNA interference of MKK4, MKK7, JNK1 and p38MAPK we tested the role of JNK/SAPK and p38 MAPK signalling during reprogramming of neonatal and adult human fibroblast. These resulted in complete abrogation of fully reprogrammed colonies and the emergence of partially reprogrammed colonies which disaggregated and were lost from culture during the maturation stage. Inhibition of JNK/SAPK signalling resulted in reduced cell proliferation, disruption of MET and loss of the pluripotent phenotype, which either singly or in combination prevented establishment of pluripotent colonies. Downregulation of p38 MAPK activity via RNA interference or small molecule inhibitor led to cell accumulation in G<sub>1</sub> phase of the cell cycle and reduced expression of cell cycle regulators. This was associated with a significant downregulation of key pluripotency marker expression, disruption of MET, increased expression of differentiation markers and presence of partially reprogrammed cells which retained a typical gene expression profile of mesendodermal cells and were unable to progress to fully reprogrammed phenotype. Together our data indicate an important role for JNK/SAPK and p38 MAPK activity in proliferation, MET progression and establishment of pluripotent phenotype, which are necessary steps for the development of human iPSCs.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ХРОМАТИНА В ДОМЕНАХ СЕМЕННИК-СПЕЦИФИЧНЫХ ГЕНОВ *DROSOPHILA MELANOGASTER*. © A. B. Недеодкина,<sup>1,2</sup> Е. Е. Храмеева,<sup>3,4</sup> С. В. Улья-

нов,<sup>1,2</sup> Ю. Я. Шевелев,<sup>5</sup> С. В. Разин.<sup>1,2</sup> <sup>1</sup> Институт биологии гена РАН, Москва, <sup>2</sup> Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, <sup>3</sup> Сколковский институт науки и технологий, Сколково, <sup>4</sup> Институт проблем передачи информации им. А. А. Харкевича, Москва, и <sup>5</sup> Институт молекулярной генетики РАН, Москва, sergey.v.ulyanov@gmail.com

Семенник-специфичные гены (CCG) представляют собой обширную группу генов, экспрессирующихся на ранних стадиях сперматогенеза. Геном дрозофилы содержит порядка 1300 CCG (около 8 % от общего числа генов), большая часть которых располагается поодиночке, однако значительное их число образует протяженные кластеры до 200 т. п. н. в длину. Запуск экспрессии CCG осуществляется в ходе дифференцировки сперматогониев в сперматоциты. Регуляция этого процесса исследована достаточно слабо, в частности неизвестно, что происходит с трехмерной организацией хроматина внутри кластеров CCG при активации их транскрипции. В данной работе мы использовали полногеномный высокопроизводительный метод фиксации конформации хромосомы (Hi-C), с тем чтобы определить степень компактизации хроматина в кластерах CCG до и после активации транскрипции. Этот экспериментальный подход основан на фиксации хроматина формальдегидом, фрагментации геномной ДНК в интактных ядрах с использованием частоцепящей эндонуклеазы рестрикции с последующим лигированием близкорасположенных фрагментов хроматина и детектированием химерных молекул ДНК (продуктов лигирования) методом высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina HiSeq 2000. По результатам оценки удельной плотности хроматиновых контактов, зависимости частоты контактов от геномного расстояния и определения профиля топологически-ассоциированных доменов хроматина мы показали, что в сперматоцитах дрозофилы происходит массивная декомпактизация хроматина в кластерах CCG. Это соотносится с недавно опубликованной моделью формирования топологически-ассоциированных доменов, согласно которой транскрикционно активные районы генома склонны к формированию менее плотных хроматиновых агрегатов, чем репрессированные районы, что обусловлено пониженной частотой межнуклеосомных взаимодействий в активных районах генома. Полученные нами данные свидетельствуют в пользу того, что активация транскрипции CCG сопровождается масштабной реорганизацией трехмерной структуры хроматина соответствующих районов генома, что указывает на функциональную взаимосвязь регуляции транскрипции CCG пространственной организации хроматина в кластерах этих генов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-24-00022).

ПОИСК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК, УЧАСТВУЮЩИХ В РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ RELA/p65-ЗАВИСИМЫХ ГЕНОВ В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ЧЕЛОВЕКА РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ. © Н. В. Паниушев, Е. В. Ломерт, Д. Г. Тентлер. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ranyushev@nextmail.ru

Транскрикционный фактор NF-κB существует в клетке в виде димеров белков семейства Rel (p50, p52, c-Rel,

RelA/p65 и RelB), которые связываются с 10—12 нуклеотидными последовательностями ДНК, называемыми κВ-сайтами. Сигнальный путь NF-κВ активируется фактором некроза опухоли (TNFa) и другими цитокинами, а также ионизирующим излучением и другими стрессорными стимулами. При активации происходит транслокация субъединиц NF-κВ из цитоплазмы в ядро, где они связываются с κВ-сайтами и активируют или подавляют экспрессию близлежащих генов. Несмотря на известный механизм активации, комбинация субъединиц, неоднородность последовательностей κВ-сайтов, разная сила связывания димеров с ДНК и другие факторы затрудняют предсказание уровня транскрипции конкретного гена после активации NF-κВ. Кроме того, активность NF-κВ определяется не только динамикой самих димеров, но и структурной организацией хроматина, а также вовлечением других транскрипционных факторов и их корегуляторов.

Для поиска общих регионов ДНК, с которыми связывается фактор NF-κВ при стимуляции TNFa, мы взяли общедоступные данные ChIP-seq экспериментов, проведенные на 13 клеточных линиях человека различного происхождения. В результате было выявлено около 500 общих для всех клеточных линий участков связывания, которые имеют схожую нуклеотидную последовательность. Из них 174 участка находятся рядом с белок-кодирующими последовательностями. Найденные участки непосредственно захватывают старт транскрипции, имеют среднюю длину в 200 пар нуклеотидов и содержат один или несколько κВ-сайтов. Возможно также, что с данными участками связываются и другие транскрипционные факторы, выполняющие роль кофакторов.

Полученные данные дают возможность предположить, что существуют общие для всех клеточных линий человека механизмы регуляции транскрипции генов при активации фактора NF-κВ с помощью TNFa. Схожая структура обнаруженных нуклеотидных последовательностей может свидетельствовать о постоянном взаимодействии NF-κВ с другими транскрипционными факторами в процессе регуляции экспрессии NF-κВ-зависимых генов.

**ЛАМИН А/С ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С СИГНАЛЬНЫМИ ПУТЬЯМИ NOTCH И WNT/β-КАТЕНИН В ХОДЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК.** © К. И. Перепелина,<sup>1,2</sup> А. Б. Малашичева.<sup>1,2</sup> <sup>1</sup>Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, и <sup>2</sup>С.-Петербургский государственный университет, kseniya.reregelina@mail.ru

Ламины А/С — основные структурные белки ядерной оболочки клетки, которые образуют упорядоченную структуру, ядерную ламину. Ламины А/С играют существенную роль в транскрипции генов, а также в регуляции процессов пролиферации и дифференцировки клеток. Точекные мутации в гене *LMNA*, кодирующем ламины А/С, приводят к тяжелым наследственным заболеваниям — ламинопатиям. Развитие ламинопатий связывают с нарушением процесса дифференцировки стволовых клеток.

Точные механизмы, посредством которых ламины могут регулировать дифференцировку клеток, к настоящему моменту не описаны. Сигнальные пути Notch и Wnt/β-катенин являются одними из основных, определяющих дифференцировочные решения клеток.

В работе использовали стволовые клетки, полученные из ткани сердца (мезенхимные стволовые клетки сердца), и исследовали эффект двух разных мутаций в гене *LMNA* на функционирование сигнальных путей Notch и Wnt/β-катенин при помощи внесения в клетки *LMNA* на лентивирусном носителе. Мутация в гене *LMNA*, несущая замену R482L, связана с заболеванием, проявляющимся в нарушении образования жировой ткани; при замене R527C в гене *LMNA* происходит нарушение костной ткани. Активацию сигнального пути Notch осуществляли с помощью введения в клетки активированного домена белка Notch — NICD. Активацию сигнального пути Wnt/β-катенин осуществляли путем введения в клетки β-катенина на лентивирусном носителе. В клетках индуцировали адипогенную либо остеогенную дифференцировку, после чего оценивали влияние мутантных форм ламина на процесс дифференцировки. Анализ активации транскрипционных мишней сигнальных путей Notch и Wnt/β-катенин проводили с помощью метода ПЦР в реальном времени, а также с помощью репортерной люциферазной конструкции. Также методом ПЦР в реальном времени проводили оценку экспрессии специфических генов дифференцировки. Для морфологического анализа дифференцированные клетки окрашивали с помощью специфических красителей.

Проведенные эксперименты указывают на то, что точечные мутации в гене *LMNA* приводят к изменению активности сигнальных путей Notch и Wnt/β-катенин, а также влияют на способность стволовых клеток к дифференцировке. Мутантные формы ламина (*LMNA* R482L в случае адипогенной дифференцировки и *LMNA* R527C в случае остеогенной дифференцировки) оказывают негативное влияние на функционирование сигнальных путей Notch и Wnt/β-катенин. При активации сигнального пути Notch мутации в гене *LMNA* приводят к снижению дифференцировочного потенциала как в отношении адипогенной, так и в отношении остеогенной дифференцировки. В условии активации сигнального пути Wnt/β-катенин показано, что мутация *LMNA* R527C оказывает негативное влияние на процесс остеогенной дифференцировки.

Таким образом, ламины А/С модулируют активность сигнальных путей Notch и Wnt/β-катенин при дифференцировке стволовых клеток.

**НЕЙРАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ/ПРОГЕНИТОРНЫЕ КЛЕТКИ СТИМУЛИРУЮТ РЕПАРАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ПОВРЕЖДЕННОМ НЕРВЕ КРЫСЫ.** © Е. С. Петрова, Е. Н. Исаева. Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, iemtrophol@yandex.ru

Нейральные стволовые/прогениторные клетки (НСПК) благодаря своим способностям вырабатывать ростовые и нейротрофические факторы широко используются в экспериментальных исследованиях для стимуляции репаративных процессов в органах центральной и периферической нервной системы. Введенные в поврежденные нервные стволы или в кондукты, соединяющие концы поврежденного нерва, НСПК могут улучшать регенерацию нервных волокон реципиента. Однако механизмы этого влияния остаются малоизученными. Целью настоящей работы явилось изучение влияния диссоциированных клеток эмбрионального спинного мозга крысы на регенерацию нерва после травмы с использованием иммуногистохимических маркеров. Работа выполнена на

крысах Вистар массой 200—250 г ( $n = 28$ ). Эксперименты осуществляли с учетом «Правил работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Седалищные нервы крыс-реципиентов повреждали путем наложения лигатуры в течение 40 с. У 15-суточных эмбрионов крыс выделяли фрагменты шейного отдела спинного мозга, содержащие НСПК, диссоциировали с помощью 0.2%-ного химопсина, пипетировали, отмывали средой без химопсина и вводили в нерв взрослых животных ( $(3-7) \cdot 10^4$  в объеме 5 мкл) субпериневрально. Перед пересадкой проводили тест на жизнеспособность клеток при помощи 0.2%-ного раствора трипанового синего. Для трансплантации использовали суспензию клеток, если жизнеспособность последних была не менее 85 %. Животным контрольной группы вводили 5 мкл среды, не содержащей клеток. Через 21, 30 и 60 сут после операции выделяли сегменты нервов в области повреждения, фиксировали в растворе цинк-этанол-формальдегида (Коржевский и др., 2012), обезвоживали и заливали в парафин. Для выявления аксонов использовали кроличьи поликлональные антитела к периферину (РЕ) (Abcam, Великобритания). Для оценки пролиферации шванновских клеток (ШК) через 30 сут после операции применяли мышиные моноклональные антитела к ядерному антигену пролиферирующих клеток PCNA (клон PC10, Dako, Дания). Наши предыдущие исследования показали, что выделенные НСПК экспрессируют селективный маркер Musashi1, выживают после пересадки в нерв в течение 2 мес и дифференцируются в нейроны и глиоциты. В настоящем исследовании проведен морфометрический анализ регенерирующих аксонов с помощью выявления РЕ. Периферин относится к белкам промежуточных филаментов (57 кДа) и в большом количестве содержится в осевых цилиндрах периферических нервных волокон. Его функция связана со стабилизацией диаметра аксона и обеспечением нормальной скорости проведения нервного импульса. Анализ поперечных срезов через нерв показал, что через 21 сут после наложения лигатуры в дистальном сегменте уже имеются содержащие РЕ регенерирующие волокна разного диаметра. Их количество в последующие сроки возрастает. Установлено, что в экспериментальной группе (с применением НСПК) число аксонов превышает контроль более чем в 1.5 раза. Одним из показателей структурно-функционального состояния нерва после повреждения является реакция ШК. ШК (или нейролеммоциты) — глиальные элементы периферической нервной системы, играющие важную роль в поддержании гомеостаза нерва. Они (наряду с макрофагами) участвуют в уборке продуктов распада миелина после валлеровской дегенерации и в ремиелинизации аксонов. ШК влияют на reparативные процессы, вырабатывая трофические факторы и белки экстрацеллюлярного матрикса. Известно, что пролиферативная активность ШК в интактном нерве очень низкая. После травмы нерва она возрастает, достигает пика в первые несколько суток, а в дальнейшем постепенно снижается. По нашим данным, через 30 сут после операции она составляет  $6.5 \pm 0.5 \%$ . Оказалось, что после введения в поврежденный нервный ствол суспензии НСПК число PCNA<sup>+</sup>ШК увеличивается приблизительно в 1.5 раза. Таким образом, показано, что трансплантация в поврежденный нерв диссоциированных клеток эмбрионального спинного мозга способствует росту нервных волокон реципиента. Одним из механизмов этого влияния является стимуляция пролиферации эндогенных нейролеммоцитов.

ТРАНСКРИПЦИЯ ПРИЦЕНТРОМЕРНОЙ САТЕЛЛИТНОЙ ДНК В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ И МИКРООКРУЖЕНИИ ПРИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЕГКОГО МЫШИ. © Н. В. Пономарцев,<sup>1</sup> А. И. Бричкина,<sup>2</sup> Н. И. Енукашвили.<sup>1</sup> <sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург и <sup>2</sup> Institute of Molecular Oncology Philipps University of Marburg, Germany, nie@newmail.ru

У высших приматов на долю кодирующих белок последовательностей ДНК приходится всего 1—2 % от генома. Большую часть генома составляют повторяющиеся элементы ДНК, которые подразделяются на диспергированные и tandemные повторы. К tandemным повторам относится сателлитная ДНК (сатДНК). Она располагается главным образом в центромерных и прицентромерных районах хромосом и образует конститтивный гетерохроматин. ДНК прицентромерных участков конститтивного гетерохроматина в тканях некоторых опухолей деконденсируется и переходит в транскрипционно активное состояние. Однако транскрипция periцентромерных повторов изучена слабо, неизвестно, может ли активация транскрипции служить прогностическим маркером.

Цель работы — исследовать транскрипцию сателлитной ДНК прицентромерного мажорного сателлита (MaSat) на модели K-ras<sup>G12D</sup>-индукции канцерогенеза в легком мыши.

Показано с помощью иммуноhistохимических, иммуноцитологических и молекулярно-биологических методов, что в опухоли уровень длинных некодирующих РНК (lncRNA) MaSat ниже, чем в прилегающей к опухоли ткани и нормальной ткани легкого здоровой мыши. При этом в культуре эпителиальных опухолевых клеток легкого мыши содержание lncRNA MaSat ниже, чем в ассоциированных с опухолью фибробластах мыши. Увеличение транскрипции MaSat в опухолевых клетках при немеллоклеточном раке легкого мыши происходит только при активации в клетках апоптоза, индуцированного ДНК-повреждающим агентом — цитостатиком цисплатином, или после теплового воздействия. В опухолевом микроокружении в фибробластах, ассоциированных с опухолью, но не в макрофагах M2 и M1 происходит резкое повышение транскрипции MaSat. Данное увеличение показано как на гистологических препаратах, так и на культурах клеток — при индукции опухолеассоциированного фенотипа фибробластов методом сокульттивирования с опухолевыми клетками или методом обработки TGF $\beta$ . Появление транскриптов сопадало с появлением маркеров опухолеассоциированного фенотипа, в том числе и признаков клеточного старения. Транскрипты выявлены только в ядре, вблизи хромоцентров. Цитоплазматические гибридизационные сигналы отсутствовали. Предварительная обработка РНКазой приводила к исчезновению сигналов. Таким образом, наблюдалась при немеллоклеточном раке легких мыши в опухоли и прилегающих тканях транскрипция прицентромерных сателлитных ДНК связана с их транскрипцией клетками микроокружения — фибробластами, ассоциированными с опухолью, а не собственно опухолевыми клетками. В дальнейшем мы планируем исследовать, связано ли накопление lnc RNA MaSat транскриптов с повышением транскрипционной активности MaSat или с нарушением процессинга lncRNA.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской научного фонда (проект 15-15-20026), Россий-

ского фонда фундаментальных исследований (проекты 15-04-01857 и 16-34-00714) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

**ОРГАНИЗАЦИЯ СТРУКТУР ХРОМАТИНА И РАЗМЕР ГЕННОЙ ДНК МАКРОНУКЛЕУСОВ ПАРАМЕЦИЙ.** © В. И. Попенко,<sup>1</sup> А. А. Потехин,<sup>2</sup> И. В. Некрасова,<sup>2</sup> Ю. Л. Иванова,<sup>1</sup> Б. П. Караджян,<sup>3</sup> О. Г. Леонова.<sup>1</sup> <sup>1</sup> Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, <sup>2</sup> Кафедра микробиологии биологического факультета С.-Петербургского государственного университета, и <sup>3</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, popenko@eimb.ru

Структурная организация хроматина и архитектура ядра в целом являются важными факторами, определяющими протекание процессов транскрипции, репликации и репарации генома. Клетки инфузорий содержат ядра двух типов: активные соматические ядра — макронуклеусы (МА) и транскрипционно неактивные генеративные ядра — микронуклеусы. Геном МА представлен относительно короткими (по сравнению с клетками Metazoa) молекулами ДНК, размер которых составляет 0.5—25 т. п. н. у видов с генным размером ДНК и до нескольких сотен тысяч т. п. н. у видов с субхромосомным размером ДНК МА. Для многих видов последних характерной формой организации интерфазного хроматина являются хроматиновые тельца (ХТ) размером 0.1—0.2 мкм. На выделенных препаратах хроматина МА инфузорий *Burasaria truncatella*, *Didinium nasutum* и некоторых видах *Paramecium* было показано, что ДНК в ХТ упакована по радиально-петельному принципу (Karajan et al. 1995. *Acta Protozool.* 34 : 135—141; Новикова, Попенко. 1998. Молекуляр. биол. 32 : 533—541; Иванова и др. 2002. Молекуляр. биол. 36 : 842—848; Леонова и др. 2004. Цитология. 46 (5) : 456—464). Однако вопрос о том, сколько молекул ДНК содержится в индивидуальных ХТ, остается открытым. Для решения этого вопроса мы провели сравнительный количественный анализ данных, полученных с помощью электронной микроскопии (ЭМ) и пульс-электрофореза (ПЭФ) на инфузориях *Paramecium tetraurelia* 51/4, *P. quadecaurelia* N1A/14, *P. multimicronucleatum MB2-5* и *P. bursaria* T316.

По данным ПЭФ, размеры ДНК МА для *P. tetraurelia* и *P. quadecaurelia* лежат в диапазоне ~70—1100 т. п. н. и для *P. multimicronucleatum* ~60—2500 т. п. н. Оцифрованные данные ПЭФ были использованы для получения спектров распределения по длинам молекул ДНК МА в этих инфузориях. Распределение молекул ДНК по длинам оказалось несимметричным: основную часть (до 40 %) составляли молекулы размером менее 200 т. п. н.

Морфологию структур хроматина в МА определяли на ЭМ ультратонких срезах. В МА *P. tetraurelia*, *P. quadecaurelia* и *P. multimicronucleatum* структуры интерфазного хроматина представлены одиночными округлыми тельцами разного размера. Были определены размеры ХТ, их объемы, построены графики распределения хроматиновых структур по размерам и оценочные спектры распределения ДНК в них.

Сравнение данных ПЭФ и ЭМ позволило сделать вывод о том, что большинство ХТ МА содержит не одну, а несколько коротких молекул ДНК, хотя небольшая часть ХТ может быть образована одиночными молекулами.

Полученные результаты хорошо согласуются с радиально-петельной моделью организации молекул ДНК в структурах хроматина макронуклеуса инфузорий, предложенной ранее (Новикова, Попенко. 1998. Молекуляр. биол. 32 : 533—541). Согласно этой модели, можно ожидать, что в макронуклеусах с очень короткими молекулами ДНК должны преобладать структуры не в виде отдельных хроматиновых телец, а в виде тяжей, что мы и обнаружили в *P. bursaria* T316. По данным ПЭФ, размер молекул ДНК *P. bursaria* T316 макронуклеуса составляет 30—150 т. п. н., которые упакованы в протяженные хроматиновые тяжи толщиной 0.15—0.2 мкм.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской фонда фундаментальных исследований (проект 15-04-06449а).

**МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА, РАСПОЗНАЮЩИЕ ЭПИТОПЫ АМАСР ВНУТРИ ЕГО КАТАЛИТИЧЕСКОГО ЦЕНТРА, НЕ ТОРМОЗЯТ ДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК ПРИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОМ ВВЕДЕНИИ.** © Б. Попов, Г. Сутула, Н. Петров. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, borisvp478@gmail.com

Альфа-метилацил-СоА рацемаза (AMACR) рассматривается как важный функциональный маркер рака различной тканевой специфичности. Снижение клеточного уровня AMACR сопровождается торможением роста опухолевых клеток. Иммунотерапия с использованием антител против AMACR затруднена из-за его внутриклеточной локализации, поэтому необходимо предварительное исследование возможности внутриклеточного введения специфических антител с последующей оценкой их противораковой активности. AMACR является ферментом, катализирующим β-окисление жирных кислот, что способствует образованию энергии, необходимой для метаболизма раковых клеток. Мы получили и охарактеризовали моноклональные антитела против AMACR человека, которые были применимы в иммуноблоте, иммунофлуоресценции и иммуногистохимии, но выявляли низкую активность в иммунопреципитации. Используя программу Pepitope и кристаллическую структуру AMACR *Mycobacterium tuberculosis*, мы впервые установили, что эпитопы AMACR, распознаваемые полученными нами антителами, локализуются внутри его каталитического центра. Протеофеクция моноклональных антител в клетки HeLa и T98G не изменяла их пролиферативную активность. Обсуждается возможность использования антител против AMACR в противораковой терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской научного фонда (проект 14-50-00068) и Российской фонда фундаментальных исследований (проект 16-04-00251).

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СОГЛАСОВАНИЯ ПРОЦЕССОВ В РАСТУЩЕЙ ВЕРХУШКЕ ГИФЫ *NEUROSPORA CRASSA*.** © Т. В. Потапова,<sup>1</sup> Л. Ю. Бойцова,<sup>1</sup> С. А. Голышев,<sup>1</sup> А. Я. Дунина-Барковская,<sup>1</sup> Т. А. Белозерская,<sup>2,3</sup> <sup>1</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, <sup>2</sup>Биологи-

ческий факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, и <sup>3</sup>Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Института биохимии им. А. Н. Баха РАН, Москва.

Исследования верхушечного роста *Neurospora crassa* свидетельствуют об особой структурной упорядоченности переднего конца гифы длиной 100—200 мкм: 1) первая септальная перегородка образуется не ближе ~165 мкм от точки роста взрослой гифы; 2) H<sup>+</sup>-АТФазы (основные генераторы мембранныго потенциала ( $E_m$ ) у *N. crassa*) встраиваются в плазматические мембранны не ближе ~120 мкм от точки роста; 3) на передних 150—200 мкм гифы  $E_m$  существенно ниже, чем в дистальной части гифы; 4) на передних 100—150 мкм гифы микротрубочки ориентируются строго параллельно оси гифы и перемещаются уже не потоком цитоплазмы, а с помощью собственной векторной сборки-разборки, требующей расхода АТФ; 5) на участке ~20—30 мкм от точки роста концентрируются нитевидные митохондрии; 6) на участке ~20—30 мкм от точки роста отсутствуют ядра. Как один из возможных механизмов создания и поддержания упорядоченного ансамбля микротрубочек и митохондрий на переднем конце растущей гифы мы рассматриваем электрическую гетерогенность переднего конца гифы (Потапова и др. 2016. Цитология. 58 (8) : 634—645).

При росте и развитии гиф *N. crassa* в условиях дефицита ресурсов — изоляции гифальных верхушек длиной ~400 мкм от мицелия и замене в среде глукозы или сахара-розы на трудно усваиваемый сорбит — нарушается согласованность удлинения, ветвления и септирования. А именно сохраняется ориентация удлинения, но уменьшаются вдвое диаметр гифы и скорость удлинения, тормозится ветвление с появлением аномально больших междуузловых расстояний, но сохраняются ритмичность септирования и расстояние между септами, так что длина верхушечного сегмента всегда примерно в 3 раза больше средней длины следующих сегментов, независимо от связи с мицелием и источника углерода в среде (Потапова и др. 2016. Цитология. 58 (8) : 634—645).

Что регулирует при этом среднюю величину расстояния между септами? Диктуется ли эта стабильность геномом или определяется процессом самоорганизации на конкретном участке гифы? Разработанную нами экспериментальную модель можно использовать для исследования согласования внутриклеточных процессов при верхушечном росте гифы *N. crassa* и анализа молекулярно-генетических механизмов регуляции взаимодействий при этом внутриклеточных структур.

**ИЗУЧЕНИЕ ИНАКТИВАЦИИ Х-ХРОМОСОМ В ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ АМЕРИКАНСКОЙ НОРКИ.** © *I. E. Пристяжнюк,<sup>1</sup> A. Г. Мензоров<sup>1,2,1</sup>* Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, и <sup>2</sup>Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, menzorov@bionet.nsc.ru

Возможность репрограммирования генома млекопитающих активно исследуется более полувека. В 1962 г. Гёрдон впервые показал возможность репрограммирования генома дифференцированной клетки факторами энуклеированного ооцита. В 2006 г. Яманака получил ин-

дуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) мыши из фибробластов с помощью всего лишь четырех транскрипционных факторов — Klf4, Sox2, Oct4 и c-Myc. Получение ИПСК поставило вопрос о полноте репрограммирования: остаются ли активными гены, экспрессирующиеся в исходных фибробластах? И насколько характеристики ИПСК соответствует эмбриональным стволовым (ЭС) клеткам, которые в данном случае являются «стандартом». В настоящее время ИПСК получены для десятков видов животных, однако ЭС-клетки — менее чем для 20. В 1993 и 2007 гг. в Лаборатории генетики развития ИЦиГ СО РАН были получены ЭС-клетки ценных пушного зверя, американской норки *Neovison vison*. Это создало уникальную возможность сравнить индуцированные и «настоящие» плюрипотентные клетки. Мы получили ИПСК американской норки и показали репрограммирование генома фибробластов на уровне анализа транскриптома (Menzorov et al., 2015). Однако помимо профиля экспрессии генов есть и другие важные характеристики плюрипотентных клеток, свидетельствующие об их стадии в развитии, например статус X-хромосом. Мы показали, что в ЭС-клетках американской норки обе X-хромосомы активны, т. е. инактивации не происходит. В случае неэпиластных плюрипотентных клеток мыши обе X-хромосомы активны, а для клеток человека статус X-хромосом зависит от «типа» плюрипотентности, naïve или primed. Полученные нами ИПСК американской норки имели кариотип 30, XY и соответственно были непригодны для изучения инактивации X-хромосом. В этой работе мы получили ИПСК американской норки из трех первичных линий фибробластов, полученных из XX-эмбрионов. Линии клеток были депонированы в ЦКР ИЦиГ СО РАН «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общебиологического и биомедицинского направления» (<http://ckr.icgen.ru/cells/>; <http://cells.biores.cytogen.ru/cells/>). Для каждого из трех генотипов были выбраны две линии ИПСК, все имели нормальный кариотип 30, XX. Анализ методом ОТ-ПЦР выявил присутствие транскриптов гена *Xist*, маркирующего инактивацию X-хромосомы. В популяции ИПСК клеток могут присутствовать дифференцированные клетки, поэтому необходимо использовать методы детекции инактивации на уровне единичных клеток. Мы использовали иммуноцитохимическую окраску на маркер неактивного хроматина (H3K27me3). Для одной линии показано отсутствие метки в островках ИПСК и присутствие в некоторых клетках на периферии, вероятно начинаяющихся дифференцироваться. Таким образом, мы успешно получили XX линии ИПСК американской норки и в одной из линий показали активность обеих XX-хромосом. В дальнейшем планируем провести анализ инактивации X-хромосом для всех линий ИПСК с использованием маркеров неактивного хроматина H3K27me3 и убиквитинированного H2A.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской фонда фундаментальных исследований (проект 17-04-00644).

**СЕКРЕТОРНЫЙ ФЕНОТИП МЕЗЕНХИМИЧЕСКИХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ РЕПЛИКАТИВНОМ СТАРЕНИИ В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ.** © *A. Ю. Ратушный, Л. Б. Буравкова*. Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Ratushkin@mail.ru

Мезенхимные стromальные клетки (МСК) представляют собой пул малодифференцированных клеток, поддерживающих во взрослом организме процессы регенерации и обновления тканей. С возрастом происходят постепенное истощение пула МСК и изменение их функционального состояния, что негативно влияет на способность к самовосстановлению организма на клеточном уровне. Одним из способов моделирования клеточного старения является долговременное культивирование *in vitro*. При этом стоит учитывать влияние факторов микроокружения, в том числе содержание кислорода, способных изменять функциональное состояние клеток.

На сегодняшний день известно, что процесс клеточного старения сопровождается приобретением специфического секреторного фенотипа (SASP — senescence associated secretary phenotype), который способен влиять на выживание, пролиферацию и дифференцировку близлежащих клеток. Помимо прочего, этот секрет может оказать еще и канцерогенное воздействие, которое во многом связывают с воздействием IL-6 и IL-8. Другими немаловажными паракринными агентами являются VEGF- $\alpha$  и TGF- $\beta$ , которые относятся к антиапоптотическим факторам, при этом VEGF- $\alpha$  обладает ярко выраженным проangiогенным действием, а TGF- $\beta$  проявляет иммуномодуляторные свойства.

В данном исследовании МСК выделяли из жировой ткани человека, длительно культивировали до 21-го пассажа в среде  $\alpha$ MEM с добавлением пенициллин-стрептомицина (1 %) и 10%-ной фетальной телячьей сывороткой в стандартных условиях ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ ) при атмосферном (21 %) и при пониженном (5 %) уровнях кислорода. Оценку количества цитокинов в кондиционированной среде осуществляли при помощи иммуноферментного анализа (ИФА).

Согласно полученным данным, содержание провоспалительного цитокина IL-6 в среде культивирования достоверно увеличивалось на поздних пассажах относительно ранних. При снижении содержания кислорода продукция IL-6 значительно не изменялась, хотя прослеживалась тенденция к уменьшению количества интерлейкина при 5 %  $\text{O}_2$  на поздних пассажах. Данные по продукции клетками IL-8 не показали достоверных различий содержания данного цитокина в кондиционированной среде в зависимости от этапа культивирования или парциального давления кислорода. Тем не менее на поздних пассажах обнаруживалась гораздо большая вариативность концентраций данного цитокина.

Анализ содержания в среде TGF- $\beta$  указывает на отсутствие выраженной зависимости продукции данного фактора роста от этапа культивирования. Однако обнаружено значимое снижение концентрации TGF- $\beta$  при культивировании ММСК при 5 %  $\text{O}_2$  на всех исследуемых пассажах. Вероятно, уменьшение продукции TGF- $\beta$  является одной из причин снижения остеогенного потенциала в гипоксических условиях.

Исследование влияния репликативного старения на продукцию VEGF- $\alpha$  показало, что максимальное содержание данного фактора в среде культивирования детектируется на средних пассажах (p12—18). При этом не выявлено значимых различий между гипоксическими и нормоксическими условиями на ранних (p2—6) и средних (p12—18) пассажах. На поздних пассажах (p19—21) в гипоксических условиях содержание VEGF- $\alpha$  было значительно меньше, чем при 20 %  $\text{O}_2$ . Таким образом, гипоксия моди-

фицирует секреторный фенотип ММСК при репликативном старении.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы «Интегративная физиология» и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-04-01244-а).

HOW MUTATIONS IN CONTRACTILE PROTEINS AFFECT CONTRACTILITY AND CALCIUM HANDLING TO TRIGGER CARDIOMYOPATHY. © C. S. Redwood. Radcliffe Department of Medicine, University of Oxford, UK, credwood@well.ox.ac.uk

The inherited heart disorder Hypertrophic Cardiomyopathy (HCM) is primarily caused by mutations in genes encoding cardiac contractile proteins, leading it to be labeled a disease of the sarcomere. Mutations in the thick filament proteins beta myosin heavy chain and cardiac myosin binding protein-C predominate, although HCM can also be caused by mutations in thin filament proteins (actin, alpha-tropomyosin, troponin subunits). The different disease of Dilated Cardiomyopathy (DCM) can also be caused by mutations in the same contractile protein genes. A different set of mutations is responsible for DCM, suggesting that distinct changes in contractile protein structure and function can lead to the different diseases. I will summarise the functional effects of the HCM and DCM mutations on cardiac contractility and its regulation, focusing on our work on mutations in troponin subunits and alpha-tropomyosin; this has shown that HCM mutations increase myofilament calcium-sensitivity and DCM mutations have the opposite effect of decreasing this parameter. I will present our recent data showing how these changes alter intracellular calcium handling and signaling in HCM, and how these alterations may trigger the disease state.

This work was funded by the Russian Science Foundation (grant 17-14-01224).

ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ ОБРАЗОВАНИЯ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ НА ОСНОВЕ  $\alpha$ -СИНУКЛЕИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДА ТИОФЛАВИНА Т. © Н. П. Родина,<sup>1,2</sup> М. И. Сулацкий,<sup>1,2</sup> Ю. А. Гагарская,<sup>1</sup> О. И. Поварова,<sup>1</sup> А. И. Сулацкая.<sup>1,1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и <sup>2</sup>С.-Петербургский политехнический университет Петра Великого, natalia240994@gmail.com

Одним из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний является болезнь Паркинсона, развитие которой сопровождается образованием в мозге пациентов нерастворимых цитоплазматических агрегатов белков — телец Леви. Основным структурным компонентом телец Леви является нейрональный белок  $\alpha$ -синуклеин ( $\alpha$ -syn) в форме амилоидных фибрилл, которые представляют собой упорядоченные нерастворимые белковые агрегаты, богатые  $\beta$ -складчатой структурой.

Для диагностики возникновения амилоидных фибрилл *in vitro* и *in vivo* широко используется специфический флуоресцентный зонд тиофлавин Т (ThT), интенсивность флуоресценции которого при встраивании в амилоидные фибриллы может возрастать на несколько порядков. Это делает ThT не только хорошим диагностич-

ческим агентом, но и инструментом для изучения процессов образования амилоидных фибрилл, а также их структуры. Проведение подобных исследований является актуальной задачей, поскольку неразрывно связано с поиском и разработкой потенциальных терапевтических агентов.

Настоящая работа была направлена на изучение кинетики образования амилоидных фибрилл на основе  $\alpha$ -syn с использованием электронной микроскопии (ЭМ), метода кругового дихроизма (КД), а также флуоресцентной и абсорбционной спектроскопии. Были зарегистрированы спектры поглощения, флуоресценции, возбуждения флуоресценции, а также кривые затухания флуоресценции ThT, что позволило оценить время жизни флуоресценции красителя, взаимодействующего с амилоидными фибриллами. Результаты, полученные с использованием различных подходов, свидетельствуют о том, что кинетика роста амилоидных фибрилл представляет собой сigmoidальную кривую. Фибрillогенез можно условно разделить на три этапа — фазу нуклеации (лаг-фазу), фазу роста фибрилл и фазу насыщения. В лаг-фазе, когда регистрируемые параметры остаются практически неизменными, происходит образование зародышей (ядер) амилоидных фибрилл, в следующей фазе начинается увеличение наблюдаемых характеристик, что показывает рост амилоидных фибрилл, далее происходит выход кривой на плато, что означает, и это весь мономерный  $\alpha$ -syn переходит в фибрillярную форму. Изменение спектров КД с постепенным увеличением содержания  $\beta$ -листов наблюдается только в фазе роста амилоидных фибрилл. При этом короткие амилоидные фибриллы, согласно данным ЭМ, образуются уже в конце лаг-фазы, а в фазе роста наблюдаются их удлинение и кластеризация. Таким образом, нами получены характеристики кинетики образования амилоидных фибрилл на основе  $\alpha$ -syn без влияния каких-либо внешних факторов. Таким образом, эти данные могут быть использованы при оценке влияния различных внешних факторов и потенциальных ингибиторов, таких как условия фибрillогенеза (рН, температура и др.), малые молекулы (SDS, ионы металлов и др.), шапероны на процесс образования амилоидных фибрилл  $\alpha$ -syn.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 16-04-01604\_а и 16-54-00230 Бел\_а), программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и стипендии президента РФ (СП-1982.2015.4).

**КЛЕТОЧНЫЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ В ФАРМАКОЛОГИИ И ТОКСИКОЛОГИИ.** © Н. Ю. Роговская, В. Н. Бабаков. ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, Санкт-Петербург, babakov@rihophe.ru

Одной из важнейших областей применения культур клеток в современной биомедицине является их использование в качестве тест-объектов при фармакологическом скрининге. Технология высокопроизводительного скрининга рассматривается в качестве ключевой на ранних этапах поиска и разработки лекарственных средств.

Современные системы ВПС способны проанализировать более 100 тыс. индивидуальных образцов в день из библиотек химических соединений на индивидуальной биомишини, что обычно позволяет выявить не более нескольких активных соединений, так называемых хитов.

Результатом является идентификация соединений, которые после прохождения клинических испытаний могут стать лекарственными средствами.

При разработке клеточных тест-систем ключевую роль играет молекулярная мишень токсического или фармакологического действия изучаемого соединения. Также в разрабатываемых тест-системах важны воспроизведимость, эффективность, стоимость и время, потраченное на операцию.

При поиске рецепторных и функциональных антагонистов MOR1-рецептора на клетках нейробластомы человека линии SH-SY5Y использовали ряд подходов к определению молекулярных мишеней фармакологической активности пептида DAMGO — агониста MOR1-рецептора. В качестве мишеней рассматривали вторичные мессенджеры — цАМФ и ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , ключевые элементы киназных каскадов, определение профиля цитокинового/хемокинового секретома. Таким образом, для оценки эффективности лигандов/антагонистов рецепторов, связанных с G-белками, был разработан набор различных клеточных тест-систем.

На этой же культуре клеток были определены внутриклеточные события и изменения в профиле экспрессии генов цитокинов/хемокинов при действии агониста TLR-рецептора — липополисахарида из *Salmonella typhosa*.

Для оценки токсического действия полигорматических углеводородов, требующих метаболической активации, на культуре клеток человека линии НераRG определяли активацию внутриклеточных киназных каскадов, ключевых регуляторов клеточного цикла и системы репарации ДНК, секрецию цитокинов в кондиционную среду при действии бенз(а)пирена с помощью многопараметрического иммунофлуоресцентного анализа по технологии Luminex xMAP. Было установлено протекторное действие димера триптофана (FICZ) — эндогенного агониста AhR-рецептора — в ответ на токсическое действие полигорматических углеводородов.

Современные постгеномные высокопроизводительные системы получения биологически значимой информации, включающие в себя массив геномных, протеомных и метаболомных данных, требуют интеграции методами и алгоритмами системной биологии для получения цельной картины биологических эффектов ксенобиотиков. При оценке биологической активности различных ксенобиотиков целесообразно контролировать различные этапы активации рецептора — накопление внутриклеточных вторичных мессенджеров, активацию киназных каскадов и транскрипционных факторов, изменения экспрессии генов, изменения профиля секреции управляемых белков.

**MODELLING OF  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  SELECTIVITY IN THE TIGHT JUNCTIONS OF EPITHELIAL CELLS.** © A. A. Rubashkin,<sup>1</sup> J. Fischbarg,<sup>2</sup> P. Iserovich.<sup>3</sup> <sup>1</sup>Institute of Cytology RAS, St.-Petersburg, Russia, <sup>2</sup>ININCA, Conicet, University of Buenos Aires, Argentina, and <sup>3</sup>SUNY Downstate, New York, USA, andrey.rubashkin@gmail.com

We have developed a theory of  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  selectivity in the tight junctions (TJ) between epithelial cells. TJ in epithelial cells are channels of width of the order of 40 Å between plane-parallel plasma membranes, filled with various macromolecules. It was shown the important role of claudin molecules,

which contain charged amino acid residues, in  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  selectivity of TJ [Colegio et al. 2002. Amer. J. Physiol. Cell Physiol. 283 : C142—C147; Van Itallie, Anderson. 2004. Physiology. 19 : 331—338; Anderson, Van Itallie. 2009. Cold Spring Harbor. Perspect. Biol. 1 : 002584-1—a002584-16].

To derive the formula by which the selectivity in TJ was calculated, we used the theory of coupled water and ion transport in TJ, which we developed earlier [Rubashkin et al. 2005. J. Membr. Biol. 208 : 251—263]. We have shown that  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  selectivity in TJ depends on the total charge of amino acid residues of claudin macromolecules inside TJ, as well as on the ion distribution coefficients between TJ and the free solution. It is shown that when the sign of the total charge of amino acid residues in TJ changes on positive, the obtained formulas predict the change of  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  selectivity in TJ to  $\text{Cl}^-/\text{Na}^+$  selectivity. The calculated value of  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  selectivity coincides with the experimental data available in the epithelial transport literature for MDCK cells [Colegio et al. 2002. Amer. J. Physiol. Cell Physiol. 283 : C142—C147]. When calculating the change in the ion solvation energy upon their transition to TJ, we used the formulas of nonlocal electrostatics, taking into account the effect of overscreening of the dielectric function of water [Rubashkin, Vorotynsev. 2016. Curr. Phys. Chem. 6 : 120—129].

In the experimental literature on ion transport in TJ the ratio of paracellular permeability for  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  of  $P_{\text{Na}^+}/P_{\text{Cl}^-}$ , equal to the ion flux ratio, is used as a measure of  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  selectivity [Colegio et al. 2002. Amer. J. Physiol. Cell Physiol. 283 : C142—C147; Van Itallie, Anderson. 2004. Physiology. 19 : 331—338; Anderson, Van Itallie. 2009. Cold Spring Harbor. Perspect. Biol. 1 : 002584-1—a002584-16]. We derived the following formula for  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  selectivity:

$$P_{\text{Na}^+}/P_{\text{Cl}^-} = 0.66(n_{\text{Na}^+}/n_{\text{Cl}^-}) \exp(-2e\phi_{\text{TJ}}/kT), \quad (1)$$

where  $n_{\text{Na}^+}$  and  $n_{\text{Cl}^-}$  are the ion distribution coefficients between the free solution and TJ. We calculated these distribution coefficients from the non-local electrostatic theory. The potential  $\phi_{\text{TJ}}$  in formula (1) is the electrostatic potential in TJ and was calculated from the formula (2) derived by us:

$$\begin{aligned} \phi_{\text{TJ}} = - (kT/e) \times \\ \times \ln \left\{ X_f / (2n_{\text{Na}^+}) + \left[ (X_f / (2n_{\text{Na}^+}))^2 + n_{\text{Cl}^-} / n_{\text{Na}^+} \right]^{1/2} \right\}, \quad (2) \end{aligned}$$

in which value  $X_f$  is the relative concentration of charged amino acid residues of claudine is defined as:

$$X_f = ([\text{COO}^-] - [\text{NH}_3^+]) / c_o, \quad (3)$$

where  $c_o$  is concentration of  $\text{NaCl}$  in free solution ( $c_o = 0.15 \text{ M}$ ).

In work [Colegio et al. 2002. Amer. J. Physiol. Cell Physiol. 283 : C142—C147; Van Itallie, Anderson. 2004. Physiology. 19 : 331—338; Anderson, Van Itallie. 2009. Cold Spring Harbor. Perspect. Biol. 1 : 002584-1—a002584-16] it was shown experimentally that claudin molecules in TJ of MDCK cells create  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  selectivity and are 4 or 5 times more permeable for  $\text{Na}^+$  than for  $\text{Cl}^-$ . Our calculations using formula (1) give this value of 4.5 for the following values of the parameters of our model:  $X_f = 0.07$ ;  $\Lambda_{\text{TJ}}/\Lambda_o = 1.5$ , where  $\Lambda$  is water correlation length (this parameter is needed to calculate  $n_{\text{Na}}$  and  $n_{\text{Cl}}$ ).

**ДИНАМИКА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ МОДИФИКАЦИЙ ГИСТОНОВ H3K9me3 И H4K5ac И ИХ СОЛОКАЛИЗАЦИЯ С ХРОМАТИНРЕМОДЕЛИРУЮЩИМ БЕЛКОМ ATRX В ДОИМПЛАНТАЦИОННОМ ЭМБРИОГЕНЕЗЕ МЫШИ. © Ж. К. Сайлау,<sup>1</sup> И. О. Боголюбова.<sup>2</sup> <sup>1</sup>С.-Петербургский государственный университет и <sup>2</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, zhuldyz.ks@mail.ru; ibogol@mail.ru**

Посттрансляционные функциональные модификации гистонов и процессы АТФ-зависимого ремоделинга хроматина остаются в центре внимания при исследовании регуляции экспрессии генов. Эмбрионы млекопитающих на начальных стадиях дробления являются традиционным объектом для анализа эпигенетических механизмов дифференциальной экспрессии генов, но при использовании подобных моделей внимание исследователей чаще всего концентрируется на стадии зиготы, когда происходят репрограммирование и объединение родительских геномов. Однако процессы интенсивных структурно-функциональных перестроек хроматинового компартимента продолжаются и на последующих стадиях доимплантационного развития. В связи с этим основной целью настоящей работы являлась иммуноцитохимическая локализация модификаций гистонов H3K9me3 и H4K5ac одновременно с хроматинремоделирующим белком ATRX в эмбрионах мыши на стадии ранней и поздней зиготы, поздней двухклеточной стадии, а также стадиях морулы и бластоциты.

Характерной особенностью распределения эпигенетической метки транскрипционно неактивного хроматина H3K9me3 на стадии зиготы является ее преимущественное присутствие в женских пронуклеусах. При этом области локализации H3K9me3 в первую очередь наблюдаются в составе кольцевого гетерохроматина, окружающего проядрышки. Данный характер мечения сохраняется и на поздней двухклеточной стадии. Напротив, на стадии морулы и бластоциты многочисленные сферические области гетерохроматина, содержащие H3K9me3, наблюдаются в нуклеоплазме, тогда как перинуклеолярная локализация H3K9me3 выявляется крайне редко.

Эпигенетическая метка транскрипционно активного хроматина H4K5ac выявляется как в женских, так и в мужских пронуклеусах зиготы, при этом в мужских пронуклеусах более выражено мечение кольцевого перинуклеолярного гетерохроматина. На поздней двухклеточной стадии большая часть H4K5ac также выявляется в составе гетерохроматина, окружающего проядрышки. Сходный характер мечения наблюдали на стадии морулы, тогда как на стадии бластоциты распределение метки носило более диффузный характер.

Солокализация H3K9me3 и белка ATRX выявляется в ядрах двухклеточных эмбрионов как в составе перинуклеолярного гетерохроматина, так и в зонах гетерохроматина, не ассоциированных с проядрышками. Интересно отметить, что, несмотря на то что H3K9me3 в настоящее время рассматривается как основной функциональный партнер ATRX, в ядрах ранних эмбрионов мыши присутствуют области, где эти белки локализованы независимо друг от друга. Не менее интересен тот факт, что ATRX в ядрах поздних двухклеточных эмбрионов мыши выявляется не только в отдельных зонах локализации эпигенетического маркера неактивного хроматина H3K9me3, но и маркера активного хроматина — H4K5ac. Солокализация H4K5ac и ATRX также является наиболее заметной на

поздней двухклеточной стадии и выявляется в отдельных областях гетерохроматина, ассоциированного с проядрышками.

Таким образом, на ранних стадиях дробления эмбрионов мыши гетерохроматин, окружающий проядрышки и не включающий Br-УТФ, т. е. являющийся транскрипционно неактивным, содержит не только маркеры транскрипционно неактивного хроматина — ATRX и H3K9me3, но и маркер активного хроматина — H4K5ac, что указывает на особое функциональное состояние перинуклеолярного хроматина в период активации эмбрионального генома.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-04-01857).

**ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ И СТРУКТУРНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ Kv-, HCN-, CNG- И EAG-ПОДОБНЫХ КАНАЛОВ У ЭУКАРИОТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ.**  
© П. Ю. Сафонов,<sup>1,2</sup> И. А. Поздняков.<sup>1</sup> <sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и <sup>2</sup>С.-Петербургский государственный университет, pozdnyakov@incras.ru

Потенциалуправляемые калиевые каналы ( $K_v$ ), калиевые (EAG), а также катионные (HCN и CNG) каналы, управляемые циклическими нуклеотидами (HCN и CNG), имеют общее эволюционное происхождение. Высокая степень родства между представителями этих групп проявляется в таких особенностях структурной организации, как например субъединичный состав и строение поры, которая имеет характерный GYG-мотив.

Несмотря на филогенетическую близость, по физиологическим функциям каналы  $K_v$ , EAG, HCN и CNG сильно различаются. Стоит отметить, что основная масса исследований, посвященных установлению структуры и функций тех или иных представителей этих семейств, проводилась в основном на каналах животных и растений, т. е. многоклеточных эукариот. В то же время отсутствие данных о каналах семейств  $K_v$ , EAG, HCN и CNG у одноклеточных эукариот затрудняет наше понимание эволюции этой группы каналов. В связи с этим существует необходимость проведения исследования на более широком круге объектов, который включал бы в себя и каналы эукариотных микроорганизмов.

Поиск гомологов каналов  $K_v$ , HCN, CNG и EAG проводился в базах данных аминокислотных последовательностей NCBI и транслированных транскриптомах Marine Microbial Eukaryotic Transcriptome Sequencing Project представителей групп Dinoflagellata, Bacillariophyta, Cryptophyta, Haptophyta, Perkinszoa, Cercozoa и Rhizophyta, Ciliata, Apicomplexa, Oomycota, Chlorophyta, Embryophyta, Euglenozoa, Apusozoa, Amoebozoa, Choanoflagellata, Fungi и Metazoa. Реконструкция филогении с помощью методов максимального правдоподобия и байесовского анализа выявило высокую степень филогенетического разнообразия внутри исследуемых групп каналов. Помимо этого, был проведен биоинформационный анализ первичной структуры важнейших функциональных элементов каналов: селективного фильтра с GYG-мотивом, а также домена связывания с циклическими нуклеотидами (CNBD) в случае нуклеотидуправляемых каналов.

Отдельный интерес вызывает тот факт, что ранее при анализе транскриптомов динофлагеллят и оомицетов

были обнаружены последовательности каналов  $K_v$  и HCN, которые обладают нехарактерным для представителей этих семейств удвоенным субъединичным составом. Присутствие подобных удвоенных последовательностей может быть либо артефактом сборки транскриптома, либо результатом экспрессии реально существующих дуплицированных генов. Первая гипотеза представляется менее вероятной, так как удвоенные последовательности выявлялись в независимо собранных транскриптомах. Для проверки второй гипотезы мы начали работу по реконструкции полной последовательности генов удвоенных каналов динофлагеллят.

**НОКАУТ СУБЪЕДИНИЦЫ ИММУНОПРОТЕАСОМ MECL-1 И РЕГУЛЯТОРНОЙ ЧАСТИЦЫ PA28 ИНДУБИРУЕТ ОБРАЗОВАНИЕ КЛОНОВ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК.**  
© А. В. Селенина,<sup>1</sup> С. А. Синенко,<sup>1</sup> У. Зайферт,<sup>2</sup> А. Н. Томилин,<sup>1</sup> А. С. Цимоха.<sup>1</sup> <sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и <sup>2</sup> Грайфсвальдский университет, Германия, a.selenina@incras.ru

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) не только представляют собой интересные объекты фундаментальных исследований, но также крайне перспективны для различных прикладных областей медицины. Несмотря на большой интерес к плюрипотентным клеткам, механизмы поддержания в этих клетках белкового гомеостаза с помощью убиквитин-протеасомной системы изучены недостаточно. Убиквитин-протеасомная система контролирует практически все основные клеточные процессы посредством посттрансляционных модификаций белков и их деградации в протеазных комплексах — протеасомах. Протеасома состоит из коровой 20S и одной или двух регуляторных 19S частиц. При определенных условиях конститутивные каталитические субъединицы 20S коровой частицы  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  и  $\beta 5$  могут замещаться на особые субъединицы —  $\beta 1i/LMP2$ ,  $\beta 2i/MECL-1$  и  $\beta 5i/LMP7$ , формируя иммунопротеасому. Существует также дополнительный регулятор конститутивной и иммунопротеасомы — PA28, который увеличивает эффективность деградации белков. Роль иммунопротеасом в процессе получения иПСК исследована крайне мало. Известно, что в процессе дифференцировки ЭСК мыши наблюдается увеличение экспрессии  $\beta 5i/LMP7$  субъединицы и PA28 частицы, что говорит о важной роли данных участников убиквитин-протеасомной системы. Литературные данные указывают на участие иммунопротеасом и их регулятора PA28 в процессе репрограммирования. Для ответа на этот вопрос мы провели репрограммирование мышиных эмбриональных фибробластов, полученных из эмбрионов мышей, нокаутных по MECL-1 и PA28 $\alpha/\beta$ , в иПСК с помощью лентивирусов, кодирующих полицистронную последовательность факторов Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc. Анализ результатов репрограммирования с помощью окраски на щелочную фосфатазу показал сильное снижение образования клонов иПСК, что свидетельствует о роли иммунопротеасом и регуляторной частицы PA28 в процессе клеточного репрограммирования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской научного фонда (проект 14-50-00068).

**РОЛЬ ЭКЗОСОМ В ТРАНСПОРТЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕАСОМ.** © А. В. Селенина, И. А. Федоров, А. С. Цимоха. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, a.selenina@incras.ru

26S протеасомы — крупные белковые комплексы, присутствующие в ядре и цитоплазме эукариотических клеток и играющие важную роль в убиквитин-зависимой деградации специфических белков в клетке. Протеолитически активные протеасомные 20S комплексы также были обнаружены в плазме крови человека, спинномозговой и альвеолярной жидкостях, а также в селе, кондиционированной культурами клеток. Интересен тот факт, что у онкологических больных наблюдается повышенное содержание протеасом в плазме крови, что позволяет рассматривать их в качестве онкомаркеров при диагностике рака. Механизмы транспорта протеасом из клетки изучены крайне мало, однако показано, что протеасомы могут транспортироваться во внеклеточное пространство в составе внеклеточных везикул — микровезикул и (или) экзосом. На сегодняшний день для очистки внеклеточных везикул используют метод последовательного центрифугирования и ультрацентрифугирования, однако такой подход не позволяет разделить микровезикулы и экзосомы, а также может приводить к повреждению везикул. Чтобы определить, какие внеклеточные везикулы транспортируют протеасомы, и исключить возможное высвобождение протеасом из разрушенных в результате длительного ультрацентрифугирования везикул, мы использовали аффинную очистку экзосом на основе маркера CD63. Тетраспанин CD63 — мембранный белок, который содержит четыре трансмембранных домена и встроен в мембрану экзосомы таким образом, что оба конца находятся внутри везикулы. Мы создали генетическую конструкцию для экспрессии рекомбинантного белка CD63 с дополнительным трансмембранным доменом, выводящим на поверхность экзосомы полипептид для аффинной очистки этой везикулы. Эффективность работы данного метода очистки экзосом была подтверждена с помощью Вестерн-блотинга, электронной микроскопии и анализа траекторий наночастиц. Несмотря на то что мы показали наличие протеасомных белков в аффинно-очищенных экзосомах клеток линий HeLa и K562, большая часть протеолитически активных внеклеточных протеасом находилась вне фракции экзосом, что указывает на альтернативный механизм транспорта внеклеточных протеасом раковыми клетками.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 16-14-10343) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-04-01667-А).

**ОПЫТ СОЗДАНИЯ МЫШЕЙ С ИЗМЕНЕННЫМ ГЕНОМОМ В ЦЕНТРЕ ТРАНСГЕННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ МГУ им. М. В. ЛОМОНОСОВА.** © П. В. Сергиев, О. А. Аверина, Е. Д. Зотова, О. А. Пермяков, А. В. Дейкин, М. Л. Ловать, Е. Т. Швецова, К. С. Петрюков, А. Я. Головина, Ю. В. Нарайкина, М. П. Рубцова, Т. И. Новолаев, А. А. Чугунова, И. А. Остлерман, О. А. Донцова. Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова.

Одна из основных задач биологии заключается в том, чтобы понять, какую функциональную роль играют от-

дельные гены в работе сложного организма. В настоящее время большинство генов млекопитающих не изучено. Почти единственный способ разобраться в функции гена — это провести его направленную инактивацию и исследовать фенотипическое проявление нокаута. Направленное редактирование генома также необходимо для создания моделей заболеваний человека с использованием лабораторных животных, как правило мышей, и поиска подходов к лечению этих заболеваний.

В последние годы редактирование геномов вообще и генома мышей в частности сделало значительный рывок вперед. С практическим внедрением системы CRISPR/Cas9 появилась возможность проводить генно-инженерные манипуляции с эукариотическими геномами с высокой эффективностью. Теперь для создания линий генно-модифицированных мышей не обязательно использовать эмбриональные стволовые клетки. Стало возможным проводить необходимые манипуляции с яйцеклетками, что сократило трудоемкость создания линий мышей и ускорило этот процесс в несколько раз.

Основным направлением работы Центра трансгенных технологий МГУ является создание и исследование линий мышей с измененным геномом. К настоящему моменту в центре трансгенных технологий уже созданы линии нокаутных мышей с инактивацией ряда генов. Помимо инактивации генов проведено гораздо более сложное и трудоемкое редактирование геномов с созданием генов гибридных белков с довесками для аффинного выделения белков и их партнеров. Проведены направленные точечные замены в изучаемых генах.

Работа по созданию самых различных модельных линий мышей поставлена на поток. Найдены оптимальные способы применения последних разработок в области редактирования геномов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской научного фонда (проект 17-75-30027).

**РЕГУЛЯЦИЯ СУТОЧНОЙ МИТОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК У ПЛАНАРИЙ.** © А. Н. Скавуляк,<sup>1</sup> Н. Д. Крещенко,<sup>1</sup> А. М. Емаков.<sup>2</sup> <sup>1</sup>Институт биофизики клетки РАН, Пущино, и <sup>2</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, nkreshch@rambler.ru

Свободноживущие плоские черви — планарии (*Turbellaria, Platyhelminthes*) — обладают высокой регенерационной способностью, выделяющей их среди представителей животного царства. Они могут регенерировать целый организм из небольшого отсеченного фрагмента тела. Процесс регенерации обеспечивается наличием в теле стволовых клеток, называемых необластами, которые дают начало всем типам клеток в ходе ежедневного клеточного самообновления или повреждения.

В работе изучали динамику пролиферативной активности стволовых клеток у планарий *Schmidtea mediterranea*. Для выявления митотических клеток использовали первичные антитела на фосфорилированный гистон-3 и вторичные иммуноглобулины с флуоресцентным зондом CF488A. Молекулы гистонов, связанные с хроматином клетки, фосфорилируются во время митотического деления и, таким образом, служат маркерами пролиферативного процесса. Измерения пролиферативной активности проводили в течение 1 сут каждые 2 ч на тотальных пре-

паратах планарий с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Leica TCS SP5 (Германия). Определяли число митотических клеток на единицу площади тела. Животные находились в условиях постоянного затемнения, в опыте раствор серотонина (1 мКМ) добавляли в среду содержания за 3 сут до проведения измерений.

У животных контрольной группы наблюдали ритмические колебания пролиферативной активности клеток с периодом около 4 ч. Распределение пиков митотической активности в течение суток имело многовершинный характер при абсолютном максимуме ( $151 \pm 3.8$ ,  $n = 12$ ), наблюдавшемся в 16 ч (Пущино, московское время), и абсолютном минимуме, отмеченном в 2 ч ночи ( $108 \pm 4.5$  клетки на 1  $\text{мм}^2$ ,  $n = 12$ ). В 2 раза ниже абсолютного максимума пик митотической активности отмечен в 24 ч, а в 6 и 12 ч наблюдали пики в 2 раза ниже предыдущего.

Серотонин изменял динамику суточной пролиферативной активности, сглаживая ритмические колебания, наблюдаемые у животных контрольной группы. В подопытной группе в темную половину суток (с 22 ч вечера до 8 ч утра) общая пролиферативная активность понижалась по сравнению с контролем и составляла 82—98 клеток на 1  $\text{мм}^2$ . В светлое время суток — с 10 до 20 ч — пролиферативная активность клеток повышалась и варьировала от 112 до 145 клеток на 1  $\text{мм}^2$ . При этом один ярко выраженный пик наблюдали в районе 12 ч ( $145 \pm 5.6$ ,  $n = 12$ ) и плато — с 14 до 20 ч, когда число пролиферирующих клеток практически не колебалось. Таким образом, серотонин изменял суточный ритм пролиферации. Оказалось, что серотонин снижал также и общий уровень пролиферативной активности, при этом суммарное за сутки число митотических клеток подопытных животных составило 76 % от уровня контрольных.

В отечественной и зарубежной литературе нам не удалось обнаружить сведения о взаимодействии серотонина с аппаратом клеточного деления. Однако известно, что у высших организмов серотонин принимает участие в регуляции циркадных ритмов. Обнаруженное влияние серотонина на ритмические колебания суточной пролиферативной активности в теле планарий свидетельствует о возможном участии нейромедиатора в формировании биоритмов, синхронизированных с продолжительностью фотопериода, которые обусловливают адаптацию этих простых организмов к 24-часовому циклу смены дня и ночи.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской фонда фундаментальных исследований (проект 15-04-05948а).

**КЛЕТОЧНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ АДАПТАЦИИ ПОТЕНЦИАЛЬНО ТОКСИЧНЫХ ЖГУТИКОНОСЦЕВ-ДИНОФЛАГЕЛЛЯТ К ОБИТАНИЮ В ПРИБРЕЖНЫХ МОРСКИХ ВОДАХ. © С. О. Скарлато.** Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, sergei.skarlato@mail.ru

Миксотрофные эукариотные микроорганизмы эффективно адаптируются к быстро изменяющимся условиям окружающей среды, что позволяет им выживать в стрессовых условиях и первыми заселять неблагоприятные биотопы. Однако тонкие механизмы адаптивности этих протистов к обитанию в условиях стресса до сих пор остаются неясными из-за недостаточной изученности

этой актуальной проблемы. В докладе будет рассмотрен широкий спектр новейших исследований, посвященных изучению миксотрофных динофлагеллят в прибрежных морских водах России. На примере потенциально токсичных видов этих жгутиконосцев с помощью мультидисциплинарного подхода и современных методов клеточной и молекулярной биологии, биогеохимии, биоинформатики, моделирования миксотрофного метаболизма единичных клеток, а также моделирования популяционных процессов будет дана количественная оценка вклада авто- и гетеротрофии в миксотрофный рост этих протистов. Будет показано, какие источники азота и углерода (органические или неорганические) предпочтительны для миксотрофных протистов на разных стадиях эвтрофирования водоемов. Впервые будут учтены баланс авто- и гетеротрофии при миксотрофном росте протистов и роль миксотрофии как фундаментального экологического процесса, зависящего от химического состава воды и в то же время влияющего на глобальные биогеохимические циклы и состояние водных экосистем. Будут приведены новые данные о клеточном цикле и ионных каналах у модельных видов протистов. Результаты этих исследований важны для прогнозирования рисков, связанных с эвтрофированием прибрежных морских вод, оценки вероятности возникновения «красных приливов» как результата массового развития токсичных видов протистов и разработка новых эффективных методов контроля «цветения» этих микроорганизмов. Эти исследования подтверждают выдвинутую нами ранее на примере Балтийского моря концепцию биологического разнообразия для солоноватоводных морей — концепцию максимума видов протистов в зоне критической солености воды (5—8 %). Полученные результаты находят практическое применение для решения острых социально значимых вопросов, связанных с охраной окружающей среды, здоровьем человека и экологическим образованием широких слоев населения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской научного фонда (проект 16-14-10116).

**УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ И ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ ПРОТЕАСОМ И ПЕРИХРОМАТИНОВЫХ ФИБРИЛЛ В КЛЕТКАХ U-937 ПРИ ИНДУКЦИИ АПОПТОЗА. © Е. С. Снигиревская, А. В. Мошков, Я. Ю. Комиссарчик.** Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, snigir@incras.ru

Индукция апоптоза в клетках культуры различными внешними агентами, модифицирующими процессы транскрипции, вызывает серьезные перестройки структуры и функции клеточного ядра. В настоящей работе изучалось воздействие двух внешних факторов, индуцирующих апоптоз в клетках культуры U-937 — гипертонического шока и этопозида. Наиболее существенным ультраструктурным признаком перехода клеток в апоптоз явилось появление в ядрах и цитоплазме этих клеток агрегатов частиц ядерного происхождения. Эти агрегаты, описанные в литературе как HERDS (Biggiogera et al. 2004. Biol. Cell. 96 : 603—615), не ограничены мембраной, имеют различные форму, плотность и размеры. В анализируемых нами агрегатах визуализированы два типа доминирующих частиц — перихроматиновые фибрillы (ПФ) и протеасомы (Пр). Как принято в современной литературе, ПФ представляют собой морфологиче-

ское выражение транскрипции пре-мРНК (Biggiogera et al. 2004. Biol. Cell. 96 : 603—615). Протеасомы, как известно, участвуют в гидролизе протеинов и нуклеопротеинов и играют важную роль в регуляции апоптоза (Siechanover. 1998. EMBO J. 17 : 71). С помощью методов стандартной и иммунной электронной микроскопии в работе анализировались ультраструктура и локализация перихроматиновых фибрill и протеасом. Показано, что ПФ представляют собой нити толщиной 12—13 нм и длиной 50—300 нм. В них мы впервые выявили периодическую структуру с периодом повторения около 10 нм. Эта периодическая структура, по-видимому, образована спирально закрученной нитью РНК толщиной 4 нм. Такую же периодичность мы наблюдали и в некоторых запасающих пре-мРНК перихроматиновых гранулах, что подтверждает их происхождение из ПФ. Кроме того, в составе агрегатов мы обнаружили протеасомы — мелкие частицы размером от 10—12 до 15—30 нм с электронно-светлой центральной частью и сравнительно электронно-плотными периферическими зонами. Ранее структурный анализ протеасом проводился лишь на выделенной фракции этих органелл. Использовались методы высокоразрешающей электронной микроскопии и рентгеноструктурного анализа (Huber et al. 2012. Cell. 148 : 727—738). Протеасомная природа этих частиц в клетках U-937 *in situ* была подтверждена иммуноцитохимически методом постимбиддинг (Snigirevskaya, Komissarchik. 2017. Acta Histochem. 119 : 471—480). Мы проследили формирование и миграцию агрегатов внутри ядра и выход их компонентов в цитоплазму через ядерные поры. Согласно полученным данным, деградация агрегатов в цитоплазме и высвобождение их содержимого в экстрацеллюлярное пространство на терминальных стадиях апоптоза происходят с помощью экзосом. Обнаружение автофагических вакуолей в апоптозных клетках свидетельствует о возможности одновременного существования двух путей деградации белков в ходе запрограммированной клеточной смерти — автофагического и протеасомного. В заключение следует подчеркнуть, что для понимания функциональных перестроек ядра в ходе апоптоза огромное значение имеет детальный ультраструктурный и иммуноцитохимический анализ изменений структуры компонентов ядра в условиях ослабления процессов транскрипции.

**СРАВНЕНИЕ МИГРАЦИОННЫХ СВОЙСТВ КЛЕТОК ГОЛО- И МЕРОКЛОНАЛЬНЫХ СУБЛИНИЙ МЕТАСТИТИЧЕСКОЙ ГЕПАТОМЫ ЗАЙДЕЛА.** © С. А. Снопов,<sup>1</sup> Г. В. Андреев, Е. И. Сахенберг, В. А. Иванов, Н. П. Терюкова.<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, <sup>1</sup>sнопов@hotmail.com; npter@yandex.ru

Отличительными чертами прогрессирования карцином являются потеря опухолевыми клетками эпителиальных характеристик и приобретение мигрирующего фенотипа. В настоящей работе сравнивали миграционные свойства клеток голо- и мероклональных сублиний, клонированных нами из монослоиной клеточной линии гепатомы Зайдела крысы (Терюкова и др., 2016). Оценивали ненаправленную миграцию клеток в тесте на «зарастание раны» (scratch assay) с помощью видео- и фотосъемки, а также организацию актинового цитоскелета в клетках методом окрашивания родамин-фаллоидином. Способы движения клеток мы изучали в среде культивирования с 10%-ной сывороткой плодов коровы в течение 24 ч. Эпи-

телиоподобные клетки мероклонов сдвигались в свободное пространство («рану») преимущественно колективно, за счет смещения краевых пластов тесно соприкасающихся клеток, и лишь единичные фибростолоподобные клетки, встречавшиеся в этих линиях, мигрировали автономно. Голоклональные линии состояли только из фибростолоподобных клеток, у которых наблюдалась только автономная миграция индивидуальных клеток с активным и хаотичным движением в пространстве «раны», без сближения обоих клеточных (рыхлых) пластов. Заполнение клетками пространства «раны», оценивавшееся нами в среде с 0.5%-ной сывороткой, происходило в основном за счет миграции клеток, без существенного вклада процесса пролиферации. Через 24 ч культивирования клетки мероклональных сублиний 1Е и 9С заполняли соответственно 45 и 56 % площади «раны», а через 48 ч — 84 и 100 %. Клетки голоклональных сублиний 3Н, 5F и 6Н через 24 ч заполняли всего 12—16 %, а через 48 ч — 17—23 % площади «раны». Несмотря на то что площадь «раны» уменьшалась быстрее в мероклональных сублиниях — за счет коллективного сдвига клеток, средняя скорость движения клеток, рассчитанная по длине пути, пройденного отдельной клеткой за время наблюдения, оказывалась почти вдвое выше в голоклональных сублиниях. Так, в сублиниях 1Е и 9С она составила  $0.49 \pm 0.30$  и  $0.51 \pm 0.26$  мкм/с, а в сублиниях 3Н, 5F и 6Н —  $1.00 \pm 0.94$ ,  $0.83 \pm 0.49$  и  $0.81 \pm 0.29$  мкм/с соответственно. Различия в средней скорости движения клеток между сравниваемыми сублиниями, очевидно, связаны с доминированием в них соответственно эпителиоподобных и фибростолоподобных клеток. У фибростолоподобных клеток всех сублиний мы наблюдали проявления пластичности, присущей опухолевым стволовым клеткам, — когда мезенхимный и амебоидный псевдоподиальный способы индивидуальной миграции сменяли друг друга. Известно, что именно амебоидное перемещение характерно для метастатических клеток и что переход от мезенхимного типа к амебоидному сопровождается снижением числа интегринопосредованных фокальных контактов с матриксом, откреплением цитоскелетных элементов, связанных с фокальными контактами, уменьшением активности цитоплазматических киназ и ГТФаз (FAK, Ras, Cdc42 и Rho), снижением способности актиновых микрофилараментов к «заякориванию», ослаблением их центростремительного натяжения и препятствиями к образованию стресс-фибрill. При анализе флуоресценции клеток, окрашенных родамин-фаллоидином, мы выявили у эпителиоподобных клеток мероклонов 1Е и 9С наличие характерных актиновых микрофилараментов в поляризованной форме, особенно в местах адгезии базальной части плазматической мембраны к подложке, а у клеток голоклонов 3Н, 5F и 6Н — отсутствие поляризованных форм актина. Таким образом, нами впервые получены свидетельства преобладания в туморогенных голоклональных сублиниях гепатомы Зайдела фибростолоподобных мигрирующих клеток с отсутствием в них поляризованного актина, с уменьшенной адгезией к подложке и исключительно индивидуальным ненаправленным движением амебоидного типа со средней скоростью более высокой, чем у клеток из мероклональных сублиний.

**БЕЛОК ДРОЗОФИЛЫ ОРВР РЕГУЛИРУЕТ НЕКОТОРЫЕ ГЕНЫ РИБОСОМАЛЬНЫХ БЕЛКОВ.** © Е. Л. Соколинская, Н. А. Золотарев, О. В. Кырчанова, О. Г. Мак-

сименко, П. Г. Георгиев. Институт биологии гена РАН, Москва, elena.sokolinskaya@gmail.com

Транскрипция у многоклеточных эукариот регулируется большим количеством разных факторов, обеспечивающих правильный уровень, место и время экспрессии каждого гена. Недавно было показано, что промоторы генов «домашнего хозяйства» и тканеспецифичных генов регулируются разными транскрипционными факторами. В геноме дрозофилы более 30 % генов находятся на расстоянии менее 1 т. п. н. друг от друга и ориентированы в противоположных направлениях. Однако чаще всего такие гены имеют сходные профили экспрессии. Промоторы таких пар генов часто обогащены инсуляторными белками, такими как CP190, BEAF-32 и dCTCF, и, вероятно, в определенном контексте могут функционировать как границы. В данной работе мы изучали структурно-функциональную организацию транскрипционного фактора Ovpb, для которого мы обнаружили специфичное связывание с очень небольшим числом сайтов в геноме (чуть более 30). При этом сайт связывания Ovpb в большинстве случаев располагается между промоторами двух генов, один из которых является геном рибосомального белка, и определенным образом ориентирован относительно промотора рибосомального гена. При нокдауне Ovpb или при нарушении его сайта связывания снижается уровень экспрессии генов рибосомальных белков. Поэтому белок Ovpb, по всей видимости, является специфичным фактором, необходимым для работы промоторов генов рибосомальных белков.

С другой стороны, мы обнаружили, что Ovpb функционирует как инсуляторный белок: он взаимодействует с CP190 (кофактором всех известных инсуляторных белков дрозофилы) и способен привлекать его на хроматин, а также может поддерживать петли ДНК в модельной системе *in vivo*.

Используя систему редактирования генома на основе CRISPR/Cas9, мы получили мух с делецией гена *opvp*. Гомозиготная мутация *opvp* значительно снижает жизнеспособность мух (выживает менее 50 % гомозиготных куколок и около 1 % взрослых особей). Выжившие гомозиготные особи стерильны. Это показывает, что Ovpb необходим для нормального развития дрозофилы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-24-00166).

**ЗАМЕНА КОСТНОГО МОЗГА КАК СПОСОБ ВОССТАНОВЛЕНИЯ СИНТЕЗА ДИСТРОФИНА МЫШЕЙ MDX.**  
© А. В. Соколова, В. М. Михайлов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, avsokolova@inbox.ru

Мутантные мыши mdx являются основной экспериментальной моделью миодистрофии Дюшенна, вызываемой мутацией в гене белка дистрофина. Клеточная терапия основана на доставке здоровых генов в составе клеток дикого типа в ткани для участия в регенерации. Одним из экспериментальных подходов может быть замена у пациентов мутантного костного мозга на костный мозг дикого типа. Первоначально было показано, что после облучения мышей mdx летальными дозами лучей Рентгена трансплантация клеток нормального костного мозга спасает животных от гибели. При этом ядра трансплантируемых клеток проникают в саркоплазму мы-

шней mdx, не восстанавливая, однако, синтез дистрофина (Wernig et al., 2005). Для преодоления блокады синтеза дистрофина нами была использована трансплантация сингенных клеток костного мозга (ККМ) мышей C57BL/6 мышам mdx, облученных лучами Рентгена в немиэлоаблативной дозе 3 Гр (Соколова и др., 2010, 2016). Химеризм был определен в опытах по трансплантации облученным мышам mdx ККМ от мышей GFP(+) C57BL/6 и составлял  $3.3 \pm 0.8\%$  (Mikhailov et al., 2012). В течение годового эксперимента иммуноморфологически было установлено, что у химер mdx синтез дистрофина в бедренной мышце возрастает от  $1.1 \pm 0.4\%$  поперечно-полосатых мышечных волокон (ППМВ) в контроле до  $28 \pm 7\%$  через 6 мес после трансплантации и понижается до  $5 \pm 1\%$  через 12 мес. При этом гибель ППМВ уменьшается от  $2.2 \pm 0.6\%$  в контроле до  $0.5 \pm 0.1\%$  в конце года после трансплантации, что указывает на усиление выживаемости ППМВ мышей mdx после замены ККМ. Доля ППМВ без центральных ядер как показателя успеха терапии растет до середины года после трансплантации от  $10 \pm 1.0$  до  $23 \pm 1.9\%$ , уменьшаясь к концу года до  $11 \pm 1.2\%$ , что подтверждает терапевтический эффект замены ККМ. Аналогичные изменения синтеза дистрофина наблюдалась в диафрагме химер mdx. Доля дистрофин-положительных ППМВ в диафрагме увеличилась от  $0.28 \pm 0.3$  до  $12 \pm 0.4\%$  через 4 мес после трансплантации. Далее происходило снижение доли дистрофин-положительных ППМВ до  $2.6 \pm 0.4\%$  через 9 мес и до  $1.5 \pm 0.5\%$  через 12 мес после трансплантации. Для оценки эффективности усиления синтеза дистрофина мы использовали анализ структуры нервно-мышечных соединений (НМС) после окраски срезов мышц (Tetramethylrhoda-min- $\alpha$ -bungarotoxinом). Определяли долю НМС, состоящих из кластеров ацетилхолиновых рецепторов, имеющих форму «ветвей», характерных для нормальных мышей C57BL, и «островков», характерных для мышей mdx. У химер mdx наблюдалось возрастание доли НМС, состоящих из кластеров ацетилхолиновых рецепторов, имеющих форму «ветвей», с  $14 \pm 3.2\%$  в контроле до  $43 \pm 5.7$ ,  $49 \pm 2.1$ ,  $48 \pm 5.1$  и до  $37 \pm 2.7\%$  через 4, 8, 11 и 12 мес после трансплантации у химер mdx, что указывает на восстановление структуры НМС. По данным кафедры физиологии СПбГУ, улучшение структуры НМС у химер mdx через 4 мес после трансплантации сопровождалось восстановлением потенциала покоя и локальной гиперполяризации концевой пластиинки НМС до уровня контрольных животных C57BL (Кравцова и др., 2011). Таким образом, впервые на мышах mdx в строенных условиях удалось восстановить синтез дистрофина при помощи замены мутантного костного мозга на костный мозг дикого типа после немиэлоаблативного рентгеновского облучения. Восстановление синтеза дистрофина влечет за собой улучшение морфологии ППМВ и восстановление структуры и электрофизиологических свойств НМС. Результат открывает перспективу для дальнейшей разработки метода немиэлоаблативной лучевой терапии болезни Дюшенна при трансплантации аллогенных ККМ. В настоящее время этот метод широко используется для лечения злокачественных заболеваний крови. Из неопухолевых заболеваний метод адаптируется для лечения некоторых лизосомальных расстройств, церебральной адренолейкодистрофии и серповидно-клеточной анемии.

Проект осуществляется при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068).

AUTONOMOUS POSITIONING OF SMALL CHROMOSOMAL REGIONS IS GOVERNED BY CHROMATIN CLASS. © Irina Solovei. Ludwig Maximilians University Munich, irina.solovei@lrz.uni-muenchen.de

To achieve a functional nuclear architecture, the genome is segregated into active euchromatin (EC) and inactive heterochromatin (HC), including constitutive heterochromatin (cHC). EC is gene-rich, includes mostly housekeeping genes, and replicates early in S-phase. In contrast, HC is gene-poor, includes tissue-specific genes, and replicates late in S-phase. Additionally, EC and HC are differentially marked by interspersed repetitive sequences, which account for up to 45 % of the mammalian genome. Short interspersed repetitive sequences (SINEs) reside mostly in gene-rich EC, whereas retrotransposon-related long elements (LINEs) and LTRs locate preferably in HC. cHC is build up by high repetitive satellite sequences.

Which mechanisms keep EC and HC apart? We propose that mutual attraction between dispersed repetitive sequences selectively enriched in EC and HC, i. e. SINEs and LINEs/LTRs, could drive the gathering of homotypic chromatin. To investigate the link between the primary genomic sequence and chromatin domains, we analyzed the spatial intranuclear arrangement of a human artificial chromosome (HAC) in a xenospecific mouse background in comparison to an orthologous region of native mouse chromosome. The two orthologous regions include segments that can be assigned to three major chromatin classes according to their gene abundance and repeat repertoire: 1) gene-rich and SINE-rich EC, 2) gene-poor and LINE/LTR-rich HC and 3) gene-depleted cHC of centromeres. We show using FISH and 4C-seq technologies that chromatin segments ranging from 0.6 to 3 Mb cluster with segments of the same chromatin class. As a consequence, the chromatin segments acquire corresponding positions in the nucleus irrespectively of their chromosomal context thereby strongly suggesting that this is their autonomous property. Interactions with the nuclear lamina, although largely retained in the HAC, reveal less autonomy. Taken together, our results suggest that building of a functional nucleus is largely a self-organizing process based on mutual recognition of chromosome segments belonging to the major chromatin classes, EC, HC and cHC.

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В ПОДДЕРЖАНИИ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ И САМООБНОВЛЕНИЯ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ ПРИ ДЕЙСТВИИ РЕСВЕРАТРОЛА. © И. И. Суворова, В. А. Постолов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, irtsuvorov@yandex.ru

Ресвератрол является фитоалексином, который обнаруживается более чем в 70 видах растений и участвует в их защите от паразитов. На различных модельных объектах был выявлен широкий спектр положительного действия ресвератрола, как например противоопухолевое, противовоспалительное, нейропротекторное, антиоксидантное, кардиопротекторное и др. Наблюдаемые эффекты ресвератрола связаны с тем, что данное соединение воздействует на множество компонентов внутриклеточной сигнализации, модулируя активность огромного числа различных белковых молекул, в частности киназ, липо- и циклооксигеназ, деацетилаз и др. Это дает основание предполагать, что ресвератрол может также положи-

тельно влиять на самообновление и плюрипотентность эмбриональных стволовых клеток мыши (мЭСК), поддерживая их недифференцированное состояние. Однако влияние ресвератрола на ЭСК практически не изучено, что позволяет получить принципиально новые данные.

В настоящей работе было показано, что обработка мЭСК ресвератролом приводит к увеличению числа клеток, находящихся в S-фазе клеточного цикла. Аккумуляция клеток в синтетической фазе клеточного цикла может свидетельствовать о формировании метаболического чек-пойнта. Однако с помощью анализа включения BrdU в делящиеся клетки было показано, что аккумуляция обработанных ресвератролом мЭСК в синтетической фазе не является следствием S-фазного блока клеточного цикла. Увеличение пролиферативной активности мЭСК при действии ресвератрола коррелирует с усилением генной и белковой экспрессий коровых маркеров плюрипотентности Oct3/4, Nanog, Sox2, Klf4 и SSEA1, а также с экспрессией факторов, поддерживающих недифференцированное состояние, *esrrb*, *prdm14*, *fgrf2* и *lin28*. Было предложено, что одним из механизмов, опосредующих положительный эффект ресвератрола на плюрипотентность мЭСК, может быть запуск аутофагии. Мы оценили количество аутофаголизосом в обработанных ресвератролом клетках с помощью окрашивания флуоресцентным зондом на основе монодансикававерина. Было показано, что образование аутофагосомных вакуолей увеличивается при действии ресвератрола уже в течение суток. Активация аутофагии подтверждалась повышенной экспрессией второй формы белка LC3-II, компонентом аутофагосомной мембранны, аккумуляцией Atg5/Atg12 и снижением количества белка p62/SQSTM1 в клетках, обработанных ресвератролом. Для детального исследования механизмов аутофагии в мЭСК при действии ресвератрола мы оценили mTOR-зависимый сигнальный путь, активация которого отрицательно регулирует аутофагию. Мы обнаружили, что добавление ресвератрола к мЭСК приводило к снижению активности киназы mTOR, а также ее мишени p70/S6K, S6K и 4E-BP1. Киназа mTOR регулирует аутофагию через ингибирующее фосфорилирование ULK1, а ингибирование mTOR снижает ингибирующий уровень фосфорилирования ULK1 и увеличивает аутофагию. Поэтому, чтобы подтвердить участие mTOR в аутофагии, вызванной ресвератролом, и изучить зависимость от ULK1, мы проанализировали уровень фосфорилирования ULK1 по ключевым а. к. остаткам, а также уровень активации киназы AMPK, которая усиливает аутофагию в ответ на истощение энергии. Согласно полученным результатам, ресвератрол индуцирует аутофагию в мЭСК через путь mTOR-ULK1, который включает в себя ингибирование киназы mTOR. Можно предположить, что положительное влияние ресвератрола на плюрипотентность и самообновление мЭСК может быть обусловлено активацией аутофагии в том числе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской фонда фундаментальных исследований (проект 16-04-01562А).

МЕХАНОЗАВИСИМЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА В КЛЕТКАХ K562. © А. В. Сударикова, В. И. Чубинский-Надеждин, В. Ю. Васильева, Ю. А. Негуляев, Е. А. Морачевская. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, vchubinskiy@gmail.com

Изменения клеточной механики вовлечены в основные аспекты жизнедеятельности клеток, включая подвижность, пролиферацию, апоптоз и дифференцировку. Передача механического сигнала в нативных клетках связана с активацией катионных каналов плазматической мембраны и реорганизацией актинового цитоскелета. Ранее нами изучены функциональные свойства стrettактивируемых катионных каналов и их активность в составе механозависимых сигнальных кластеров. Выявленные ионные механизмы локальной кальциевой сигнализации являются важной составляющей клеточной механотрансдукции и могут обеспечивать специфичность передачи сигнала. В различных клетках млекопитающих, в том числе клетках крови, найдены также потенциалнезависимые (non-voltage-gated) натриевые каналы, активность которых критически зависит от состояния кортикальных микрофилааментов, но не от деформации или растяжения мембранны. В настоящее время функциональная роль актинуправляемых (actin-gated) натриевых каналов и их связь с клеточной механикой неясны. Настоящая работа направлена на исследование механизмов регуляции мембранныного потенциала в электроневозбудимых клетках и оценку предполагаемого вклада актинуправляемых (actin-gated) натриевых каналов, которые ранее были также идентифицированы как амилорид-чувствительные, «атипичные» каналы ENaC. Основной экспериментальной моделью служили клетки миелоидной лейкемии человека K562, в которых данные каналы и их связь с динамикой примембранныго актина изучены наиболее детально. Судя по результатам приживленной флуоресцентной микроскопии с использованием анионного красителя DiBAC4(3), внеклеточная подача деструктора микрофилааментов цитохалазина D приводила к деполяризации мембранны. Обнаружены также натрийзависимые изменения мембранныного потенциала при стимуляции протоком жидкости, вероятно связанные с активностью mechanochувствительных каналов. В экспериментах патч-кламп (whole-cell регистрация интегральных и унитарных токов) проверены предположения о возможной механозависимой активации каналов в мемbrane клеток K562 в ответ на стимуляцию протоком (flow activation). Определены характеристики одиночных каналов: значения проводимости и экстраполированного потенциала реверсии близки к аналогичным параметрам для натриевых каналов, активирующихся при разборке цитоскелета или протеолитическом расщеплении субъединиц канала при наружном приложении трипсина. В совокупности получены новые данные о молекулярной природе и путях регуляции актинуправляемых натриевых каналов — потенциальных модуляторов мембранныного потенциала в трансформированных клетках крови. Сделан вывод об общих внеклеточных механизмах, контролирующих активность амилорид-чувствительных каналов ENaC транспортного эпителия почки и атипичных каналов ENaC в клетках миелоидной лейкемии K562. Как в лейкозных, так и в нормальных клетках крови повышение натриевой проницаемости вследствие активации каналов будет приводить к деполяризации мембранны.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 15-04-02950 и 16-04-00467).

УРОВЕНЬ СОДЕРЖАНИЯ ПРОЛАКТИНА И ФСГ В ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ SUS SCROFA DOMES

*TICUS* И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ СТАТУС ООЦИТОВ.  
© Т. И. Станиславович,<sup>1</sup> Т. И. Кузьмина,<sup>1</sup> И. П. Шейко,<sup>2</sup>  
А. И. Ганджа.<sup>2</sup> <sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных, Санкт-Петербург—Пушкин, и <sup>2</sup>РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларусь по животноводству», Жодино, IIIfor@mail.ru

Разработка эффективных биомаркеров качества донорских ооцитов, используемых в клеточных репродуктивных технологиях (получение эмбрионов *in vitro*, клонирование, трансгенез и создание линий эмбриональных стволовых клеток) позволит значительно повысить интенсификацию внедрения вышеуказанных технологий в биомедицину и животноводство. Селекция ооцит-кумлюсных комплексов по морфологическим признакам не позволяет увеличивать выход эмбрионов из созревших и оплодотворенных *in vitro* ооцитов свиней выше 40 %. Использование BCB-теста, основанного на различии в активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в растущих (BCB-) и завершивших фазу роста (BCB+) ооцитах, выявило высокие потенции ооцитов BCB+ к оплодотворению *in vitro* и развитию эмбрионов по сравнению с ооцитами BCB- (Kuzmina et al. 2015. Anim. Reprod. Sci. 12 : 604). Цель настоящего исследования — определить уровень содержания ФСГ и пролактина в жидкости фолликулов (ЖФ), содержащих ооциты в различном функциональном состоянии (растущие или завершившие фазу роста). Для определения функционального статуса ооциты инкубировали в фосфатно-солевом буфере, содержащем 13 мкМ бриллиантового кристаллического голубого (BCB, B-5388), в течение 90 мин при 38.5 °C в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> и 90 % влажности). В результате воздействия BCB оплазма ооцитов BCB- теряет окраску, а в ооцитах BCB+ остается окрашенной (Egerszegi I. et al. 2010. Reprod. Fertil. Develop. 22 : 830—838). Уровень ФСГ и пролактина определяли методом иммуноферментного анализа (фотометр STAT Fax 2100, набор реагентов фирмы «Хема»). Всего исследовано содержимое 787 фолликулов диаметром 3—6 мм (491 фолликул, содержащий ооциты BCB+, и 296 фолликулов, содержащих ооциты BCB- из 178 яичников в фолликулярной фазе от 89 свинок породы ландрас в возрасте 6—8 мес. Эксперименты проведены в 3-кратной повторности. Для сравнения результатов использовали критерий χ<sup>2</sup> (статистическая программа Sigma Stat). Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали при трех уровнях значимости: *p* < 0.05, *p* < 0.01, *p* < 0.001. Выявлены достоверные различия в уровне содержания пролактина и ФСГ в ЖФ, содержащих ооциты в различном функциональном состоянии. Так, концентрация пролактина в ЖФ с ооцитами BCB+ составила 3.15 ± 0.37 нг/мл, а в ЖФ с ооцитами BCB- — 2.12 ± 0.34 нг/мл (*p* < 0.05). Содержание ФСГ в ЖФ, содержащих ооциты BCB+, превысило такое же в ЖФ с ооцитами BCB- (6.47 ± 0.71 против 3.4 ± 0.46 нг/мл, *p* < 0.05). Ранее обнаружено, что высокое содержание ФСГ в ЖФ женщин обеспечивает высокую компетентность содержащихся в них ооцитов к созреванию и дальнейшему оплодотворению (Revelli et al. 2009. Reprod. Biol. & Endocr. 7 : 40). В наших исследованиях завершение фазы роста ооцита сопровождается высоким содержанием ФСГ в ЖФ. Разноречивые данные представлены в литературе по оценке уровня содержания пролактина в жидкости овариальных фолликулов и качества женской гаметы. В наших исследованиях показано,

что различия в уровнях содержания гипофизарных гормонов, в частности ФСГ и пролактина, в ЖФ, содержащих ооциты в различном функциональном статусе, могут быть использованы в качестве прогностических показателей завершенности фазы роста ооцитов *Sus Scrofa Domestica*.

**СТРУКТУРНЫЕ СВОЙСТВА БЛИЖНЕИНФРАКРАСНОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА iRFP713 ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ДЕНАТУРИРУЮЩИХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ.** © Олеся В. Степаненко,<sup>1</sup> Ольга В. Степаненко,<sup>1</sup> И. М. Кузнецова,<sup>1</sup> В. В. Верхуша,<sup>2</sup> К. К. Туроверов.<sup>1</sup> <sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и <sup>2</sup> Колледж медицины Альберта Эйнштейна, Нью-Йорк, lvs@incras.ru

В настоящей работе мы исследовали структурные свойства iRFP713, принадлежащего к семейству ближнеинфракрасных флуоресцентных белков (NIR FPs), применяемых в качестве проб для приживленной визуализации процессов, происходящих в отдельных клетках и в целом организме, с высоким разрешением в реальном масштабе времени. NIR FPs в качестве хромофора используют биливердин (BV), ковалентное присоединение которого влияет на стабильность и фолдинг белка. Ковалентное связывание BV с консервативным остатком цистеина в PAS-домене белка или с введенным остатком цистеина в участке -SPXH-GAF-домена оказывает существенное влияние на спектральные свойства NIR FPs. Наличие в структуре iRFP713 биливердина в качестве хромофора и необычного структурного элемента — узла — делает его интересным объектом для исследования процессов фолдинга.

Было показано, что наличие узла в структуре iRFP713 не препятствует его эффективному рефолдингу. При исследовании процессов разворачивания — сворачивания iRFP713 под действием гуанидин гидрохлорида (GdnHCl) и гуанидин тиоцианата (GTC) был выявлен сдвиг величины середины денатурационного перехода белка, регистрируемый по параметрам триптофановой флуоресценции, в область больших концентраций денатуранта по отношению к величине этого параметра, регистрируемого по флуоресценции хромофора или кругового дихроизма в дальней УФ-области. В присутствии GTC этот эффект был более выражен. Равновесные эксперименты по гель-фильтрации и кинетические спектроскопические измерения позволили нам выявить формирование двух промежуточных состояний в процессе разворачивания iRFP713. Показано, что iRFP713 накапливается в нативоподобной мономерной форме, склонной к агрегации. Агрегация мономерной формы iRFP713, вероятно, вызвана нейтрализацией поверхностного заряда белка ионами GdnH<sup>+</sup>.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-04-01515).

**ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНОГО КРАУДИНГА НА ФОЛДИНГ ЗЕЛЕНОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА СУПЕР-ФОЛДЕРА sfGFP.** © Ольга В. Степаненко, Олеся В. Степаненко. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, sov@incras.ru

Высокая суммарная концентрация биологических макромолекул в клетке создает условия, которые принято называть условиями макромолекулярного краудинга. Макромолекулярный краудинг ограничивает свободное пространство, поскольку большая часть объема занята макромолекулами, уменьшает количество свободной воды и влияет на свойства растворителя. Очевидно, условия экспериментов, проводимых в сильно разбавленных растворах, далеки от реальных клеточных условий. Условия макромолекулярного краудинга *in vitro* моделируют высокими концентрациями нейтральных полимерных молекул — «краудинг-агентами». Принимая во внимание ограничение доступного исследуемым белкам объема, или эффект исключенного объема, можно предположить, что присутствие краудинг-агентов должно приводить к стабилизации компактного нативного состояния белка, а также сдвигать равновесие в сторону олигомерных и агрегированных форм белков. Очевидно, что условия макромолекулярного краудинга будут оказывать существенное влияние на биологические процессы, зависящие от доступного объема, такие как сворачивание белков, агрегация неправильно свернутых белков, образование амилоидных фибрилл и т. п.

В настоящей работе мы исследовали влияние нескольких краудинг-агентов — полиэтиленгликоля (ПЭГ) различной мол. массы (600, 8000 и 12 000 Да), Декстрана-70 и Фикола-70 — на спектральные свойства и процессы разворачивания — сворачивания суперфолдера зеленого флуоресцентного белка sfGFP под действием гуанидин тиоцианата (GTC). Показано, что краудинг-агенты не оказывают влияния на структуру sfGFP. Однако влияние используемых краудинг-агентов на конформационную стабильность sfGFP существенно различается. Присутствие Декстрана-70 и Фикола-70 не приводит к регистрируемому сдвигу денатурационных кривых sfGFP под действием GTC даже при их высокой концентрации. ПЭГ оказывает влияние на конформационную стабильность sfGFP, однако эффект этого краудинг-агента зависит от его молекулярной массы и концентрации сложным образом. При концентрации ПЭГ 8 % краудинг-агент с наибольшей молекулярной массой оказывает дестабилизирующий эффект на структуру sfGFP, а в присутствии двух других ПЭГ устойчивость sfGFP к действию GTC увеличивается. При концентрации 20 % ПЭГ оказывает стабилизирующий эффект на структуру sfGFP, возрастающий с увеличением молекулярной массы краудинг-агента. В противоположность этому при наибольшей исследуемой концентрации (30 %) ПЭГ меньшей молекулярной массы оказывает наиболее выраженный стабилизирующий эффект на sfGFP.

Наши данные свидетельствуют о том, что классическая теория исключенного объема недостаточна для описания поведения биомолекул в условиях макромолекулярного краудинга. Мягкие взаимодействия между тестируемой молекулой и краудинг-агентом могут моделировать эффект исключенного объема, усиливая или ослабляя его. Однако неизменность структуры sfGFP в присутствии всех используемых краудинг-агентов свидетельствует о том что в данном случае отсутствует прямое взаимодействие между sfGFP и полимерами. Данные настоящего и ряда других исследований показывают, что краудинг-агенты могут дополнительно оказывать существенное влияние на свойства растворителя. Различное моделирование свойств растворителя в значительной степени определяет протекание биологических процессов в густонаселенной клеточной среде.

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

**СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К АНАЛИЗУ КАРИОТИПА КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА И КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ СНО.** © В. Н. Стефанова,<sup>1</sup> А. В. Петров,<sup>2</sup> Н. М. Ярцева.<sup>1</sup> <sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и<sup>2</sup>Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург, veste-fan@mail.ru

В настоящее время в биофармацевтической промышленности для получения нескольких десятков тонн рекомбинантных белков в год интенсивно используются клетки линии яичника китайского хомячка (СНО). Небольшое число разнообразных по форме и размерам хромосом в кариотипе китайского хомячка ( $2n = 22$ ) и сравнительная простота культивирования способствовали широкому распространению дериватов этих линий в разных лабораториях и потребовали в свою очередь их цитогенетическую паспортизацию.

В задачу нашей работы на первом этапе входил классический цитогенетический анализ монослоевой и первой полученной в России суспензионной линий СНО<sup>dhfr</sup>, являющихся производными линии СНО-DBX11, с помощью GTG-метода дифференциального окрашивания. Моносомия была отмечена для хромосом 7 и 8 в обеих линиях СНО<sup>dhfr</sup> и для хромосомы 9 в суспензионной линии СНО<sup>dhfr</sup>. Кариотипы обеих исследованных линий имеют многочисленные перестройки хромосом, различающиеся в обеих линиях незначительно. Различия между линиями заключаются в преобразовании del(5)(p1.2) в add(5)(p1.2), включении части делеции хромосомы 7 в der(6)t(1;6) и моносомии хромосомы 9. Анализ литературных данных позволил выявить пять общих для всех линий СНО хромосомных перестроек — del(2), inv(3), add(6), del(9), mar 3. В нашем исследовании в кариотипах линий СНО<sup>dhfr</sup> и СНО<sup>dhfr</sup>/susp были обнаружены три уникальные структурные перестройки хромосом — del(1), der(6)t(1;6) и mar1. Однако следует отметить трудоемкость подобных исследований и значительные временные затраты на их проведение.

Поэтому на втором этапе нашей работы была поставлена задача создания автоматического классификатора хромосом китайского хомячка на базе отечественной программы «Карто 3.1» (ООО ВидеоТест, Санкт-Петербург).

Для этого были приготовлены препараты эмбриональных фибробластов китайского хомячка, GTG-окрашенные хромосомы вручную вводили в классификатор с помощью микроскопа Axio Skop A1 ProgRes MF и компьютера с установленным программным обеспечением «ВидеоТест Карто 3.1». С помощью CCD-камеры высокого разрешения были получены четкие изображения метафазных пластинок китайского хомячка и построены кариограммы 110 взятых в анализ метафаз высокого качества. Хромосомы идентифицировали согласно существующей номенклатуре хромосом китайского хомячка с уровнем разрешения в 325 дисков (Ray, Mohandas, 1976). В базу классификатора было загружено 2018 хромосом с разной степенью конденсации и с четко выраженным рисунком G-дисков.

Проверка работы классификатора в автоматическом режиме на популяции фибробластов из другой серии

опытов показала, что чаще всего неправильное распознавание затрагивало самые маленькие хромосомы набора (9 и 10), а также ориентацию гомологов второй пары хромосом. При этом ошибка распознавания (1—5 % для разных хромосом) не превышала допустимых пределов для исследований такого рода. Вместе с тем анализ клеточных линий в автоматическом режиме выявил значительную частоту ошибочного распознавания хромосом с перестройками, что потребовало корректировки их идентификации.

Следовательно, классификация хромосом клеточных линий СНО значительно упрощается и ускоряется с помощью автоматического классификатора, но требует обязательной финальной корректировки построенных кариограмм специалистом.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ЭКСИМЕРОВ МОЛЕКУЛАМИ ТИОФЛАВИНА Т В ВОДНОМ РАСТВОРЕ И В СВЯЗАННОМ С АМИЛОИДНЫМИ ФИБРИЛЛАМИ СОСТОЯНИИ.** © А. И. Сулацкая,<sup>1</sup> М. И. Сулацкий,<sup>1</sup> Н. П. Родина,<sup>1,2</sup> И. М. Кузнецова,<sup>1</sup> К. К. Туроверов.<sup>1,2</sup> <sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и<sup>2</sup>С.-Петербургский политехнический университет Петра Великого, ansul@mail.ru

Флуоресцентный зонд тиофлавин T (ThT) широко и эффективно используется для диагностики образования и исследования структуры амилоидных фибрилл, однако представления о его фотофизических свойствах и модели его связывания с фибрillами до сих пор неоднозначны. Несмотря на то что в литературе существуют убедительные доказательства мономерной модели связывания красителя с фибрillами, продолжают появляться работы, в которых исследователи пытаются найти доказательства того, что ThT встраивается в фибрillы в агрегированной форме. В частности, в одной из недавних работ с использованием квантово-химических расчетов были показаны принципиальная возможность формирования эксимеров молекулами ThT и флуоресценция красителя, инкорпорированного в фибрillы, без каких-либо экспериментальных доказательств была приписана эксимерной форме ThT. В связи с этим целью настоящей работы стало экспериментальное обоснование возможности (или невозможности) формирования эксимеров молекулами красителя в водном растворе и в связанном с амилоидными фибрillами состоянии.

Были исследованы фотофизические характеристики красителя в водном растворе в широком диапазоне его концентраций — спектры поглощения, флуоресценции, возбуждения флуоресценции, а также времена жизни и анизотропия флуоресценции. Ключевым моментом при определении интенсивности флуоресценции ThT стало использование спектрофлуориметра Cary Eclipse, который в отличие от большинства современных приборов позволяет исследовать растворы в экстремально широком диапазоне их концентраций — (0—3 · 10<sup>-2</sup> M) — при одних и тех же условиях эксперимента. С использованием специально разработанного протокола была проведена коррекция зарегистрированных значений интенсивности флуоресценции ThT на первичный и вторичный эффекты внутреннего фильтра, что в настоящее время даже опытными исследователями либо не выполняется вообще, либо выполняется некорректно.

Полученные результаты позволили впервые экспериментально показать, что ThT образует эксимеры при вы-

сокой концентрации в водных растворах. Показано, что спектр флуоресценции эксимеров ThT существенно сдвинут в длинноволновую область ( $\lambda_{\max} = 570$  нм) по сравнению со спектром флуоресценции мономерного красителя в водном растворе ( $\lambda_{\max} = 490$  нм). Также показано, что спектр флуоресценции эксимеров ThT не имеет ничего общего со спектром флуоресценции красителя, встроенного в амилоидные фибриллы ( $\lambda_{\max} = 480—488$  нм в зависимости от амилоидогенного белка), которые практически совпадают со спектром флуоресценции свободного красителя в водном растворе. Полученные результаты позволили получить экспериментальное подтверждение того факта, что ThT встраивается в амилоидные фибриллы в мономерной форме, а возрастание интенсивности его флуоресценции при этом обусловлено только молекуллярно-роторной природой красителя, и, следовательно, нет оснований предполагать образование агрегатов молекулами красителя в связанном с фибриллами состоянии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 16-04-01614\_а и 16-54-00230 Бел\_а), программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и стипендии президента РФ (СП-1982.2015.4).

**НОВАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ БИОЛОГИИ МИГРИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕИНИЦИРУЮЩИХ КЛЕТОК — ГОЛОКЛОНАЛЬНЫЕ СУБЛИНИИ ИЗ АСЦИТНОЙ ГЕПАТОМЫ ЗАЙДЕЛА.** © Н. П. Терюкова,<sup>1</sup> Е. И. Сахенберг, В. А. Иванов, С. А. Снопов.<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, <sup>1</sup>ptter@yandex.ru; snopov@hotmail.com

Согласно иерархической модели клеточной организации опухолей, только небольшая субпопуляция клеток обладает опухолеиницирующим потенциалом, экспрессирует маркеры стволовых клеток соответствующей ткани, обладает пластичностью и обеспечивает лекарственную резистентность опухоли. В отношении этой особой субпопуляции клеток в литературе используют такие взаимозаменяемые термины, как «опухолевые стволовые клетки (ОСК)» и «опухолеиницирующие клетки (ОИК)». Предполагается, что ОИК с миграторным фенотипом обеспечивают диссеминацию злокачественных клеток в организме и образование метастазов. Существует ряд подходов для получения клеточных популяций, обогащенных ОСК, в числе которых — тест на образование голоклонов при культивировании. Согласно имеющимся данным, голоклоны образуются из клоногенных ОСК и содержат ОИК, тогда как мероклоны — из прогениторных клеток ранней стадии дифференцировки.

Гепатома Зайдела, индуцированная у крыс 4-диметиламиноазобензолом более 50 лет назад, прошла основные этапы опухолевой прогрессии в рамках первичной солидной опухоли (Зайдела, 1963). В результате спонтанного разрыва капсулы первичной опухоли в брюшную полость крыс отделились клеточные островки, давшие начало асцитной форме опухоли — промежуточному этапу на пути диссеминации опухолевых клеток в паратрахеальные лимфатические узлы. С целью изучения биологии клеток метастатической опухоли мы эксплантировали клетки гепатомы из асцитической жидкости в культуру *in vitro* и селектировали монослойную линию клеток. Дальнейшее клонирование клеток этой линии с

помощью метода предельных разведений позволило нам получить сублинии, которые произошли из голо- и мероклонов и принципиально различаются по клеточному составу, морфологии, морфометрическим показателям и миграционным свойствам клеток.

Мы показали, что введение беспородным крысам клеток голоклональных сублиний гепатомы Зайдела приводит к развитию асцитной опухоли и гибели примерно 50 % животных. Впервые определили, что эти клетки имеют фибробластоподобную морфологию, формируют рыхлый монослои без плотных межклеточных контактов и активно внедряются в свободное пространство в teste на «зарастание раны», используя амебоидный тип индивидуальной миграции; на их клеточной поверхности мы выявили N-кадхерин — маркер мезенхимных клеток, в наружной мемbrane и цитоплазме хеморецептор CXCR4 — маркер ОСК и мигрирующих клеток. Напротив, клетки мероклональных сублиний не индуцируют асцитной гепатомы, имеют преимущественно эпителио-подобную морфологию, формируют плотный монослои и используют преимущественно коллективный способ миграции.

С помощью метода непрямой иммунофлуоресценции мы выявили у клеток гепатомы Зайдела маркеры стволовых/прогениторных клеток печени EpCAM и Ov6, маркер эпителиально-мезенхимного перехода Snail1; обнаружили ядерную локализацию цитоплазматического домена EpCAM — EpICD, которая указывает на активацию EpCAM-сигнального пути и метастатическую природу опухоли. Предварительные данные свидетельствуют об экспрессии и ядерной локализации в клетках гепатомы транскрипционного фактора Oct3/4 — маркера «стволовости» и плюрипотентности клеток.

Таким образом, мы впервые клонировали и охарактеризовали сублинии голоклональных ОИК с миграторным фенотипом. Считаем, что выявление различий в геноме, транскриптоме, протеоме и метаболоме у клеток голоклональных и мероклональных сублиний гепатомы Зайдела — перспективный путь для определения важнейших молекулярных признаков метастатических ОИК и мишней для направленного противоопухолевого воздействия.

**РАЗРАБОТКА НОВОГО МЕТОДА ДЕТЕКТИРОВАНИЯ СИСТЕМНО ВВОДИМЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ОРГАНИЗМЕ.** © Г. В. Тимин,<sup>1</sup> В. А. Рыжов,<sup>2</sup> Б. П. Николаев,<sup>3</sup> М. А. Шевцов,<sup>1</sup> Е. Н. Толкунова.<sup>1,1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, <sup>2</sup>Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константина НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, и <sup>3</sup>Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепараторов, Санкт-Петербург, grifonsky@rambler.ru

В данной работе предлагается новый подход для получения биораспределения стволовых клеток после их системного введения в организм, основанный на методе регистрации второй гармоники намагниченности продольного нелинейного отклика. Для использования данного метода клетки должны быть помечены наночастицами, обладающими собственным магнитным моментом, такими как магнитные наночастицы (МНЧ) магнетита. Магнитный отклик МНЧ имеет существенно нелинейную зависимость от напряженности действующего магнитного поля. При этом величина действительной компоненты второй гармоники намагниченности прямо пропорцио-

нальна количеству частиц, обладающих собственным магнитным моментом, в исследуемом образце. Это позволяет надежно детектировать МНЧ в клетках и оценивать количество меченых наночастицами клеток в различных тканях организма посттитально.

Данный подход был применен нами для изучения тропизма мезенхимных стволовых клеток (МСК) к опухоли мозга на крысиной модели С6 глиомы. Феномен направленной миграции МСК к опухоли мозга открывает возможности для применения МСК в таргетной противоопухолевой терапии глиом. Известно, что при внутривенном введении МСК, несущих терапевтический агент, только часть клеток достигает опухолевого очага, тогда как оставшаяся часть оседает в здоровых органах, тем самым делая их побочными мишениями противоопухолевой терапии. В связи с этим приобретает актуальность исследование биораспределения МСК в организме при системном введении.

Клеточная культура МСК была получена из красного костного мозга взрослых крыс, во всех экспериментах использовали клетки на 2—3-м пассажах. Магнитное мечение МСК проводили путем добавления в ростовую среду МНЧ магнетита, покрытых декстрановой оболочкой. Эффективное накопление наночастиц в клетках было показано методами конфокальной микроскопии в отраженном свете, электронной микроскопии, ЯМР-релаксометрии и методом регистрации нелинейного магнитного отклика. Глиому индуцировали путем интракраниального введения клеток линии С6 крысиной глиомы. Спустя 10 сут после имплантации опухоли животным внутривенно вводили меченные наночастицами МСК. Методом регистрации нелинейного магнитного отклика показано значительное различие в накоплении магнитного сигнала в опухоли и в здоровом участке мозга через день после введения клеток. Присутствие МСК в опухоли было подтверждено гистологически. Данные биораспределения находятся на стадии накопления и статистической обработки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068).

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВ CLAMP и MSL2 НЕОБХОДИМО ДЛЯ СПЕЦИФИЧНОГО ПРИВЛЕЧЕНИЯ КОМПЛЕКСА ДОЗОВОЙ КОМПЕНСАЦИИ НА X-ХРОМОСОМУ.** © Е. А. Тихонова, В. Могила, П. Г. Георгиев, О. Г. Максименко. Институт биологии гена РАН, Москва, maksog@mail.ru

Определение пола у многих животных обеспечивается разным числом половых Х-хромосом — у самцов (Х0 или XY) и самок (XX). При этом соматические клетки обоих полов имеют одинаковый уровень экспрессии сцепленных с Х-хромосомой генов. Это происходит благодаря процессу дозовой компенсации. Дозовая компенсация Х-хромосомы у дрозофилы достигается путем удвоения экспрессии большинства ассоциированных с Х-хромосомой генов у самцов. Для этого процесса необходима сборка рибонуклеопротеидного комплекса, специфичного для самцов — male-specific lethal (MSL). MSL-комплекс состоит из белков MSL1, MSL2, MSL3, ацетилтрансферазы MOF и РНК-хеликазы MLE, а также минимум одной из некодирующих РНК — roX1 и roX2. Этот комплекс распространяется по Х-хромосоме самцов и обеспечивает повышенный уровень экспрессии генов

данной хромосомы благодаря работе гистонацетилтрансферазы MOF, что приводит к выравниванию уровней экспрессии генов Х-хромосомы у самцов и самок. Первичная посадка комплекса дозовой компенсации происходит за счет узнавания особых последовательностей на Х-хромосоме. Однако, как именно обеспечивается специфичность такого связывания и последующего распространения комплекса исключительно по Х-хромосоме, неизвестно. Сайты первичного связывания комплекса дозовой компенсации колокализуются с белком MSL2, экспрессирующемся только у самцов, и ДНК-связывающим белком CLAMP, экспрессирующимся и у самцов, и у самок. Стоит отметить, что CLAMP взаимодействует с сайтами как на Х-хромосоме, так и на аутосомах. В своей работе мы обнаружили, что белок CLAMP способен напрямую взаимодействовать с белком MSL2. При этом удаление CLAMP-взаимодействующего участка из молекулы MSL2 приводит к нарушению связывания комплекса дозовой компенсации с Х-хромосомой. Эти результаты свидетельствуют о ключевой роли взаимодействия белков MSL2 и CLAMP в процессе организации специфичной посадки комплекса дозовой компенсации на Х-хромосому. Возможно, это взаимодействие необходимо для дискриминации аутосомных сайтов от Х-хромосомных, что обеспечивает распространение комплекса дозовой компенсации исключительно по участкам Х-хромосомы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-74-20155).

**ИК-СПЕКТРОСКОПИЯ КОМПЛЕКСОВ ДНК С ДИХЛОРОДИАММИНПЛАТИНОЙ(II).** © В. И. Травкина,<sup>1</sup> Е. Е. Тымченко,<sup>1</sup> И. А. Белая,<sup>1</sup> Е. В. Чихиржина,<sup>2</sup> А. М. Поляничко.<sup>1</sup> <sup>1</sup>С.-Петербургский государственный университет и <sup>2</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, travkinaveronika@gmail.com

ИК-спектроскопия является методом, позволяющим получить информацию о молекулярной структуре химических соединений в любом агрегатном состоянии. По изменению полос поглощения можно судить о структурных изменениях в самой молекуле, например при взаимодействии ДНК с противоопухолевыми препаратами. Цис-дихлородиамминплатина(II) (цис-ДДП) является одним из наиболее известных и успешных противораковых агентов. В рамках данной работы проводили поиск и отождествление колебательных полос в ИК-спектре ДНК, чувствительных к связыванию ДДП.

В настоящей работе измерения производили на спектрометре Tensor 27 (Bruker, Германия) в разборных кюветах, в диапазоне 800—4000 см<sup>-1</sup>, концентрация ДНК во всех пробах составляла 20 мг/мл, в качестве растворителя использовали D<sub>2</sub>O. Методом анализа второй производной полученных спектров производили их декомпозицию на гауссовы кривые. Данный метод позволяет получить информативный набор полос поглощения, в том числе детектировать отдельные полосы колебаний связей карбонильных групп, которые не удается выделить из-за сложной суперпозиции. С помощью данного метода была собрана информация о колебаниях связей C=N<sub>7</sub> (1562 см<sup>-1</sup>), C—N(H<sub>2</sub>) (1576 см<sup>-1</sup>) и C=O (1678 см<sup>-1</sup>) в гуанине, C=O в цитозине (1678 см<sup>-1</sup>), C=O (1660 см<sup>-1</sup>), C=O (1698 см<sup>-1</sup>) в тимине и в кольцах тимина (1643 см<sup>-1</sup>) и аденина (1621 см<sup>-1</sup>) ДНК: частота и интенсивность по-

глощения, относительное количество соответствующих групп в веществе. Был произведен анализ изменения этих характеристик при увеличении концентрации изомеров ДДП в растворе. Полученные нами результаты позволяют заключить, что 7 из 8 исследуемых групп (кроме кольца аденина) являются чувствительными к связыванию с изомерами ДДП. Таким образом, данный метод является перспективным для исследования взаимодействия ДНК с подобными препаратами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-08-06876). Часть работ была выполнена с использованием оборудования ресурсных центров С.-Петербургского государственного университета: «Оптические и лазерные методы исследования веществ», «Криогенный отдел», «Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и наноэлектроники».

**ВЛИЯНИЕ ИНГИБИРОВАНИЯ СТРЕТЧ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ НА АКТИВАЦИЮ АНАБОЛИЧЕСКОГО СИГНАЛИНГА В М. SOLEUS КРЫСЫ В ОСТРЫЙ ПЕРИОД РЕАДАПТАЦИИ ПОСЛЕ ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКИ.** © С. А. Тыганов, Т. М. Мирзоев, Б. С. Шенкман. Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, sentackle@yandex.ru

Понимание молекулярных механизмов восстановления постуральной мышцы после атрофии, вызванной функциональной разгрузкой, является чрезвычайно важным для космической физиологии и реабилитационной медицины. Тем не менее процессы, запускающие анаболические сигнальные пути в скелетной мышце во время острого периода восстановления после функциональной разгрузки, являются слабо изученными. Целью данного исследования была оценка роли стретч-чувствительных каналов (SAC) в реализации механического сигнала, который может быть задействован в регуляции инициации трансляции мРНК в камбаловидной мышце крысы в раннем периоде реадаптации после антиортостатического вывешивания. Для проведения 14-суточного антиортостатического вывешивания и последующего 12-суточного восстановления были использованы самцы крыс Wistar. In vivo блокирование SAC во время восстановления осуществлялось с помощью инъекции хлорида гадолиния (10 мг на 1 кг массы животного). С помощью Вестерн-блоттинга производили анализ степени фосфорилирования ключевых маркеров синтеза белка. Мы наблюдали достоверное снижение уровня фосфорилирования рибосомальной киназы p70 (p70S6k), 4E-связывающего белка (4E-BP1), а также рибосомального белка S6 после 14-суточного вывешивания относительно контрольного уровня ( $p < 0.05$ ). В течение 12-часового восстановления уровень фосфорилирования этих маркеров достоверно увеличился даже по сравнению с контролем ( $p < 0.05$ ). Введение соли гадолиния во время восстановления предотвращало повышение фосфорилирования p70S6k, белка S6 и 4E-BP1, тем самым оставляя его на контролльном уровне. Таким образом, полученные нами данные показывают, что SAC задействован в передаче механического сигнала во время восстановления после механической разгрузки скелетной мышцы, а также участвует в активации сигнальной системы mTORc1.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-34-00530а).

**ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ЯДЕРНОЙ ЛАМИНЫ В УСТАНОВЛЕНИИ И ПОДДЕРЖАНИИ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ХРОМАТИНА *DROSOPHILA MELANOGASTER*.** © С. В. Ульянов,<sup>1,2</sup> Е. Е. Храмеева,<sup>3,4</sup> А. А. Галицина,<sup>1,4,5</sup> А. В. Лужин,<sup>1</sup> А. А. Гаврилов,<sup>1</sup> Ю. Я. Шевелев,<sup>6</sup> С. В. Разин.<sup>1,2</sup> <sup>1</sup>Институт биологии гена РАН, Москва, <sup>2</sup>Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, <sup>3</sup>Сколковский институт науки и технологий, Сколково, <sup>4</sup>Институт проблем передачи информации им. А. А. Харкевича, Москва, <sup>5</sup>Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, и <sup>6</sup>Институт молекулярной генетики РАН, Москва, sergey.v.ulyanov@gmail.com

Ядерная ламина представляет собой белковую сеть, выстилающую ядерную мембрану изнутри. Основными компонентами этой структуры ядра являются ламины, формирующие трехмерную сеть, и трансмембранные белки, такие как ламин-В-рецептор, эмерин и NET-белки. Известно, что приламинарное пространство является препрессорным ядерным компартментом, где депонируются нетранскрибуемые в данном клеточном типе гены и прочие неактивные районы генома. Ранее с использованием метода DamID было показано, что значительная часть генома млекопитающих, дрозофилы и нематоды депонирована в приламинарном пространстве и формирует так называемые ламиноассоциированные домены (ЛАДы), значительно перекрывающиеся с топологически-ассоциированными доменами ТАДами. Несмотря на интенсивные исследования, в значительной мере неизвестными остаются механизмы закрепления хроматина дрозофилы на ядерной ламине и ее роль в поддержании трехмерной структуры генома. В данной работе мы картировали топологию хроматина в клетках S2 дрозофилы с помощью метода Hi-C на фоне нокдауна ламина Dm0 и показали, что деплеция ламина приводит к 1) перемещению приламинарного хроматина во внутренние области ядра и к 2) падению плотности контактов внутри ТАДов. Второе особенно выражено в отношении ТАДов, обогащенных ламиноассоциированными участками генома. Кроме того, с использованием метода ChIP-seq мы показали, что деплеция ламина сопровождается повышением общего уровня ацетилирования гистона H3 внутри ТАДа, что, согласно недавно опубликованной модели формирования ТАДов в геноме дрозофилы, само по себе может приводить к декомпактизации хроматина внутри ТАДов. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют в пользу того, что ядерная ламина играет заметную роль в поддержании пространственной структуры хроматина в масштабе всего генома.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 16-14-10081).

**СТАТУС ХРОМАТИНА РАСТУЩИХ ИЛИ ЗАВЕРШИВШИХ ФАЗУ РОСТА ООЦИТОВ *BOS TAURUS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ФОЛЛИКУЛОВ РАЗНОГО ДИАМЕТРА.** © Е. С. Усенбеков,<sup>1</sup> Т. И. Кузьмина,<sup>2</sup> В. Ю. Дени-

сенко,<sup>2</sup> А. А. Иманбаев.<sup>1</sup> <sup>1</sup> НАО «Казахский национальный аграрный университет», Алматы, и <sup>2</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных, Санкт-Петербург—Пушкин, usen03@mail.ru

Компетентность донорских ооцитов к завершению мейотического созревания и дальнейшему оплодотворению *in vitro* (качество гаметы) — главнейший фактор, определяющий успех вспомогательных репродуктивных технологий в медицине и животноводстве. Популяция ооцитов, выделяемых из антракальных фолликулов, гетерогенна. Морфологические критерии, применяемые в настоящее время для оценки ооцит-кумуллюсных комплексов (ОКК), недостаточно информативны. Перспективным представляется использование прижизненного ВСВ-теста, основанного на разнице в ответной реакции ооцитов (окраска ооплазмы) в различном функциональном состоянии при воздействии бриллиантового кристаллического голубого (ВСВ). Основа теста — способность фермента Г6ФД конвертировать окраску ВСВ из голубой в бесцветную в растущих ооцитах (ВСВ<sup>-</sup>), в цитоплазме завершивших стадию роста ооцитах (ВСВ<sup>+</sup>) ооплазма не теряет цвет. Выход эмбрионов на стадии бластоцисты, полученных при оплодотворении *in vitro* ооцитов ВСВ<sup>+</sup>, значительно выше, чем при оплодотворении ооцитов ВСВ<sup>-</sup> (Alm et al. 2005. Theriog. 63 : 2194—2205). Выявление особенностей физиологии ооцитов ВСВ<sup>-</sup> позволит разработать методы дозревания *in vitro* ооцитов, не завершивших фазу роста *in vivo*. Цель настоящего исследования — анализ хроматина ВСВ-тестированных ооцитов (количество ядрышек) из фолликулов разного диаметра. ОКК извлекали из фолликулов с высоким тургором и обширной сетью капилляров, диаметрами < 3 мм, 3—5 мм и ≥ 6 мм. В экспериментах использовали ооциты с гомогенной ооплазмой, равномерной по ширине зоной пеллюцида, окруженные не менее 5—6 слоями кумуллюсных клеток. После извлечения ОКК подвергали в течение 90 мин воздействию 26 мкМ ВСВ (B-5388), растворенном в PBS, инкубировали в СО<sub>2</sub>-инкубаторе при 38.5 °C. Хроматин визуализировали 10 мкг/ml DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) в соответствии с описанным ранее протоколом (Kyogoku et al. 2011. Mol. Repr. Develop. 78 : 426—435). В экспериментах использовали реагенты производства фирмы Sigma (Sigma-Aldrich). Образцы анализировали на флуоресцентном микроскопе Carl Zeiss Axio Imager.A2m. Для сравнения результатов использовали *t*-критерий Стьюдента. Подсчет числа ядрышек осуществляли в ооцитах на стадии диплотены (диффузная). Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали при трех уровнях значимости — *p* < 0.05, *p* < 0.01 и *p* < 0.001 для 3 независимых экспериментов. Всего проанализирован 151 ооцит — 85 ВСВ<sup>+</sup> и 66 ВСВ<sup>-</sup>. В результате экспериментов были выявлены достоверные различия в количестве ядрышек (среднее число ядрышек/ооцит) между ооцитами ВСВ<sup>+</sup> и ВСВ<sup>-</sup>, выделенными из фолликулов разного диаметра. Так, в ооцитах ВСВ<sup>+</sup> из фолликулов диаметром < 3 мм этот показатель составил 8.9 ± 2.8, диаметром от 3 до 5 мм — 5.2 ± 1.9, диаметром ≥ 6 мм — 3.8 ± 1.7, а в ооцитах ВСВ<sup>-</sup> — 31.7 ± 5.3, 27.8 ± 6.2 и 24.9 ± 5.8 соответственно (*p* < 0.01). В процессе роста фолликула отмечена тенденция к снижению в количестве ядрышек как в ооцитах ВСВ<sup>+</sup>, так и в ооцитах ВСВ<sup>-</sup>, что свидетельствовало о снижении синтетических процессов в завершающих фазу роста ооцитах. С

учетом того, что компетентность к созреванию приобретается ооцитом лишь по завершении фазы роста, отбор для экстракорпорального созревания ооцитов ВСВ<sup>+</sup>, как завершивших фазу роста объясняет их высокие пр спективные потенции к созреванию и оплодотворению *in vitro*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан (0115PK00728).

**ЯДЕРНЫЙ РЕЦЕПТОР NR4A3 ВЫЗЫВАЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ К ДОКСОРУБИЦИНУ.** © О. А. Федорова,<sup>1</sup> Т. С. Леонова,<sup>1,2</sup> А. А. Дакс,<sup>1</sup> О. Ю. Шувалов,<sup>1</sup> Е. А. Васильева,<sup>1</sup> А. В. Петухов,<sup>1,3</sup> Н. А. Барлев.<sup>1</sup> <sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, <sup>2</sup> С.-Петербургский государственный университет и <sup>3</sup> Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург.

Доксорубицин, являющийся антрациклиновым антибиотиком, на данный момент входит в большинство стандартных схем химиотерапии рака молочной железы. Доксорубицин действует как интеркалирующий агент, ингибируя ДНК-топоизомеразу II и вызывая двухцепочечные разрывы ДНК, что в свою очередь приводит к гибели клеток. Однако раковые клетки зачастую приобретают резистентность к доксорубицину, что приводит к неэффективности лечения. Поэтому выявление новых биомаркеров, свидетельствующих о резистентности к доксорубицину, является важной задачей современной молекулярной медицины. Было показано, что усиление экспрессии NR4A2 в клеточной линии рака молочной железы MCF7 приводит к снижению экспрессии проапоптотического гена *BAX* после обработки доксорубицином, что в свою очередь приводит к подавлению апоптоза. Кроме того, для NR4A1 также были показаны зависимость экспрессии и развитие резистентности в случае рака молочной железы. Члены семейства ядерных рецепторов (NR4A1, NR4A2 и NR4A3) являются ДНК-связывающими транскрипционными факторами, которые играют роль в ключевых биологических процессах, таких как эмбриональное развитие, клеточный метаболизм, воспаление, пролиферация, миграция клеток и апоптоз. Для исследования влияния NR4A3 на чувствительность клеток рака молочной железы к доксорубицину в данной работе была использована клеточная линия рака молочной железы MDA-MB-231 с различным статусом экспрессии NR4A3 (MDA-MB-231 с оверэкспрессией NR4A3 и MDA-MB-231 с подавленной экспрессией NR4A3). Значение концентрации, вызывающее 50%-ное ингибирование роста популяции клеток (IC50), после обработки доксорубицином для клеточной линии MDA-MB-231 с оверэкспрессией NR4A3 были значительно ниже, чем у контрольных клеток. Таким образом, усиление экспрессии NR4A3 приводит к тому, что клеточная линия MDA-MB-231 становится менее чувствительной к доксорубицину. Вестерн-блот-анализ и ОТ-ПЦР в реальном времени показали, что профиль экспрессии проапоптотических генов, таких как PUMA и Bax, был ниже в клеточной линии с оверэкспрессией NR4A3 по сравнению с контрольной клеточной линией после обработки доксорубицином. Кроме того, сравнение уровня апоптоза на основании окраски антителами к Аннексину V в клеточ-

ной линии MDA-MB-231 с оверэкспрессией NR4A3 и контрольной после обработки доксорубицином показало заметное снижение числа апоптотических клеток. Данный эффект был также подтвержден с использованием клеток MDA-MB-231 с подавленной экспрессией NR4A3. Обобщая полученные данные, можно сделать вывод о том, что NR4A3 опосредует устойчивость к доксорубицину в клеточной линии рака молочной железы MDA-MB-231.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 16-34-60228 мол\_а\_дк и 16-34-00869 мол\_а).

**ОРГАНИЗАЦИЯ МИКРОТРУБОЧЕК НА АППАРАТЕ ГОЛЬДЖИ: ИДЕНТИФИКАЦИЯ НОВЫХ УЧАСТНИКОВ.** © А. И. Фокин,<sup>1</sup> И. Б. Бродский,<sup>1</sup> Е. М. Чудинова,<sup>2</sup> Е. С. Надеждина,<sup>1,2</sup> А. В. Бураков.<sup>1</sup> <sup>1</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, и <sup>2</sup>Институт белка РАН, Пущино, antburakov@genebee.msu.ru

Микротрубочки клеток животных образуют веретено деления при митозе и обеспечивают везикулярный транспорт, поляризацию и направленное движение клеток в интерфазе. Архитектура сети микротрубочек определяется работой центров их организации (ЦОМТ), на которых идут процессы нуклеации и зажоривания. В интерфазе в качестве ЦОМТ помимо центросомы могут выступать также мембранные аппараты Гольджи или ядерная оболочка. Вклад альтернативных ЦОМТ в процесс организации интерфазных микротрубочек сильно зависит от типа клеток; при этом молекулярные механизмы их работы до сих пор изучены фрагментарно. В ходе наших исследований мы показали, что две линии клеток, выделенных из эпителия почки зеленой мартышки, — Vero и BS-C-1 — сильно различаются степенью участия аппарата Гольджи в организации микротрубочек; при этом активность центросом в клетках обеих линий оказалась одинаковой. Выяснилось, что в клетках Vero аппарат Гольджи в качестве ЦОМТ практически не работает, и это делает их удобным экспериментальным объектом, с помощью которого можно выявить минимально необходимый набор белков для работы этого альтернативного центра организации. На сегодняшний день есть две гипотезы, объясняющие удержание микротрубочек аппаратом Гольджи. Согласно первой, это происходит при помощи белков CLASP, связывающихся с поверхностью Гольджи через трансмембранный белок GCC185, возможно при посредстве белка Arl4A. Вторая гипотеза предполагает рекрутование гамма-тубулина белком AKAP450, связывающимся с мембранными Гольджи при помощи белков GM130 и GRASP65. Чтобы активировать неработающий аппарат Гольджи, мы экспрессировали в клетках Vero флуоресцентно слитые CLASP2 и Arl4A поодиночке и совместно, а также принудительно привязывали на мембранные Гольджи CLASP2 и AKAP450 путем создания химерных конструкций с таргетирующей последовательностью — GRIP-доменом. Хотя в ряде случаев организация микротрубочек в трансфицированных клетках сильно менялась, опыты по их восстановлению показали, что заметного повышения активности Гольджи как ЦОМТ не произошло. Это говорило о возможном наличии дополнительных

участников процесса удержания микротрубочек на Гольджи. Чтобы выяснить это, мы провели количественный анализ транскриптомов клеток Vero и BS-C-1 и обнаружили, что транскрипционная активность практически всех генов, кодирующих ранее изученные белки, удерживающие микротрубочки на Гольджи, существенно не различается. Однако заметную разницу продемонстрировали гены, кодирующие одну из изоформ гамма-тубулина, малоизученный белок Arl7 того же семейства, что и Arl4A, и практически неизученный белок, взаимодействующий с микротрубочками и входящий в состав матрикса Гольджи — Jaktmip2. Мы изготовили соответствующие генетические конструкции и трансфицировали их в клетки Vero, после чего анализировали морфологию микротрубочек и восстановление их после предварительной разборки. Полученные результаты позволяют нам сделать предварительные выводы об обнаружении новых неизвестных ранее белков, участвующих в удержании микротрубочек на поверхности альтернативного центра организации — аппарата Гольджи.

**ВЛИЯНИЕ ОСМОЛИТОВ НА КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ФОЛДИНГА КРЕАТИНКИНАЗЫ.** © А. В. Фонин, И. М. Кузнецова, К. К. Туроверов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, alexfonin@incras.ru

В ответ на осмотический стресс в клетках практически всех живых организмов происходит накопление низкомолекулярных органических веществ — осмолитов. Высокие концентрации осмолитов в клетках наблюдаются не только при экстремальных значениях внеклеточного осмотического давления, но также при экстремальных значениях pH среды, температуры, концентрации солей во внутриклеточном пространстве. В стрессовых условиях в клетке происходит значительное увеличение доли развернутых, частично развернутых, неправильно свернутых и агрегированных форм белков. Известно, что многие осмолиты способствуют существенному увеличению стабильности нативных белков, предотвращают их агрегацию и индуцируют рефолдинг белков из развернутого и частично развернутого состояния. Большинство работ, посвященных влиянию осмолитов на белки, сфокусировано на исследовании стабилизации нативных белков в растворах осмолитов. Рефолдинг развернутых белков в аналогичных условиях практически не изучен. В настоящей работе методом остановленного потока исследовано влияние ряда осмолитов (триметиламинооксида (TMAO), бетамина, таурина и сарказина) и стабилизаторов (гуанидинкарбоната ( $Gdn_2CO_3$ ) и гуанидинсульфата ( $Gdn_2SO_4$ )) на кинетические процессы сворачивания и денатурации креатинкиназы из развернутого состояния, полученного в результате денатурации гуанидингидрохлоридом ( $GdnHCl$ ). Креатинкиназа — димерный белок, достаточно быстро сворачивающийся с образованием нескольких промежуточных состояний, что позволяет исследовать влияние осмолитов различной химической природы на скорость достижения белком нативного и промежуточных состояний при рефолдинге. Установлено, что бетаин, сарказин, таурин и TMAO увеличивают скорость достижения креатинкиназой как нативного состояния, так и состояния типа расплавленной глобулы. Наиболее высокая скорость сворачивания креатинкиназы обнаружена в высококонцентрированных растворах

рах TMAO (1—2 М TMAO). Белковые стабилизаторы  $\text{Gdn}_2\text{CO}_3$  и  $\text{Gdn}_2\text{SO}_4$  увеличивают скорость достижения развернутой креатинкиназой состояния типа расплавленной глобулы, однако в растворах этих соединений не наблюдается сворачивания креатинкиназы в нативное состояние, вероятно вследствие того, что присутствие в растворах  $\text{Gdn}_2\text{CO}_3$  и  $\text{Gdn}_2\text{SO}_4$  препятствует димеризации креатинкиназы. Полученные данные позволяют заключить, что наиболее вероятным механизмом увеличения скорости сворачивания креатинкиназы в растворах осмолитов является ингибиование этими соединениями агрегации возникающих в процессе рефолдинга кинетических интермедиатов белка.

**РЕГУЛЯЦИЯ ПРОТЕАЛИЗИНА СИСТЕМОЙ QUORUM SENSING.** © O. A. Цаплина. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Бактерии рода *Serratia*, стойкие к стандартным методам стерилизации и дезинфекции, являются источником внутрибольничных инфекций. Однако механизмы вирулентности этих бактерий изучены недостаточно. Ранее мы показали, что к инвазии в клетки эукариот способны бактерии *S. proteamaculans*. Эта способность коррелирует с синтезом в бактериях *S. proteamaculans* актин-специфической протеазы протеализина и появляется только на поздней стационарной стадии роста. Неинвазивные бактерии *E. coli* после трансформации плазмидой, несущей ген протеализина, приобретают способность проникать в клетки эукариот, а их экстракти ограниченно расщепляют актин.

Многие факторы вирулентности бактерий регулирует система Quorum Sensing (QS), отвечающая за индукцию определенного набора генов в ответ на повышение плотности популяции. Подавление системы QS может уменьшать степень патогенности бактерий для животных, однако данных о влиянии системы QS на инвазивную активность бактерий нет. Бактерии *Serratia* обладают системой QS Lux-типа. В этих системах синтаза SprI катализирует реакцию получения N-ацил-гомосеринлактона (АГЛ). При высокой концентрации АГЛ связываются с бактериальным рецептором SprR, позволяя регулировать транскрипцию генов мишени. Задачей работы было определить влияние инактивации генов синтазы SprI и рецептора SprR, основных участников системы QS (штаммы любезно предоставлены сотрудниками лаборатории И. А. Хмель, ИМГ РАН), на активность протеализина и инвазивную активность бактерий *S. proteamaculans*. Инактивация гена синтазы SprI приводит к значительному уменьшению протеолитической активности, а инактивация гена рецептора SprR не приводит к изменению протеолитической активности бактериальных экстрактов. Для того чтобы определить, регулирует ли система QS протеализин на стадии экспрессии протеализина или активации ферmenta, мы исследовали профиль экспрессии протеализина после инактивирования генов системы QS. С помощью метода ПЦР в реальном времени было показано, что инактивация гена синтазы SprI приводит к уменьшению экспрессии протеализина в 2 раза, а инактивация гена рецептора SprR не влияет на экспрессию протеализина. Для того чтобы определить, приводят ли изменение активности протеализина к изменению инвазивной активности, с помощью микробиологического метода была исследована инвазивная активность штаммов с

инактивированной системой QS. Инактивация обоих генов системы QS привела к увеличению инвазивной активности бактерий в 2—3 раза. При этом инактивация гена рецептора SprR приводит к усилению инвазивной активности на стадии проникновения в клетку-хозяина, а инактивация гена синтазы SprI приводит к увеличению инвазивной активности бактерий в результате усиления способности к адгезии. По данным масс-спектрометрии, субстратом протеализина может быть белок внешней мембранный OmpX. OmpX является гомологом QS регулируемого белка Rck Salmonella, способствующего адгезии бактерий. Таким образом, в регуляции инвазивной активности бактерий с инактивированным геном рецептора SprR протеализин не задействован, а уменьшение активности протеализина в бактериях с инактивированным геном синтазы SprI может приводить к накоплению непрощепленного белка OmpX и увеличению адгезии и в результате инвазии бактерий с инактивированной системой QS.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской научного фонда (проект 17-74-10045).

**A NEW ROLE FOR SMOOTH MUSCLE CELLS IN ATHEROSCLEROSIS.** © Olga A. Cherepanova. Department of Molecular Physiology and Biological Physics, Robert M. Berne Cardiovascular Center, and University of Virginia, Charlottesville, VA, oac4x@virginia.edu

Atherosclerosis is a leading cause of death worldwide. Despite success with statin treatment, there is little understanding of the molecular and cellular mechanisms that can help to reverse atherosclerotic development and/or decrease the chances of clinical sequelae. Vascular smooth muscle cells (SMC) are the main players during atherosclerosis development. Unlike other myogenic cells, SMC are not terminally differentiated and can undergo phenotypic transitions to a less differentiated, but more synthetic, migratory and proliferative phenotype following vascular injury as well as in disease states including atherosclerosis (Owens et al. Physiol. Rev., 2004). This phenotypic switching is characterized by reduced expression of SM marker genes, including *Myh11*, *Acta2*, *Tagln* and *Cnn1*, which have confounded efforts to clearly define the role of the process in cardiovascular disease due to difficulties in identifying what cells are SMC-derived. Of major importance, study from our lab, using SMC lineage tracing atherosclerotic (*Apoe<sup>-/-</sup>*) mice, revealed that > 80 % of SMC within atherosclerotic lesion cannot be detected using traditional SMC endogenous lineage markers. Moreover, more than 25 % of lesion cells expressing traditional markers of macrophages (MΦ) and 13 % cells expressing markers of mesenchymal stem cells are SMC-derived (Shankman et al. Nat. Med., 2015).

To further investigate a functional role of these «hidden» phenotypically modulated SMC during atherosclerosis development we generated two SMC-specific knockout mouse lines where we deleted, exclusively in SMC, either Kruppel-like factor 4 (KLF4) or Octamer-binding transcriptional factor 4 (OCT4), both iPS pluripotency factors, which play important role in SMC phenotypic switching based on observations *in vitro*.

Importantly, we found that knock out of *Klf4* and *Oct4* in SMC led to completely opposite effects on atherosclerotic lesion development. Knockout of *Oct4* led to a marked increase

in lesion size and decrease in multiple indices of plaques stability, at least in part through inhibiting SMC migration (Cherpanova et al. Nat. Med., 2016). Knockout of *Klf4* led to decreased lesion size, and an increase in plaque stability at least in part through a decrease in number of MФ-like SMC in the lesion (Shankman et al. Nat. Med., 2016).

Taken together, our results provide the first direct evidence that SMC play a critical role in lesion pathogenesis, but contrary to the long-standing dogma in the field, show that phenotypically modulated SMC can play both athero-promoting as well as atheroprotective role during atherogenesis depending on the direction of SMC phenotypic transition.

In addition, comparative ChIP-seq and RNA-seq analyses on samples isolated from SMC-specific *Klf4* and *Oct4* knockout atherosclerotic lesions revealed a list of differentially regulated KLF4 versus OCT4 target genes, including Toll-like receptor 4, that can be potentially used to develop new SMC targeting therapeutic approaches.

**ПРОТЕОМ ЦЕЛОМИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ МОРСКОЙ ЗВЕЗДЫ *ASTERIAS RUBENS* В НОРМЕ И ПРИ ТРАВМИРОВАНИИ.** © С. В. Шабельников, Н. С. Шарлаимова, Д. Е. Бобков, О. А. Петухова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, buddasvami@gmail.com

Иглокожие представляют интерес для сравнительных исследований механизмов регенерации, поскольку обладают огромным регенеративным потенциалом, а также относятся к вторичноротым беспозвоночным и являются группой, родственной хордовым, что позволяет ожидать наличия сходства в механизмах регенерации.

В настоящей работе были исследованы изменения белкового состава бесклеточной целомической жидкости, вызванные травмированием, на примере морской звезды *Asterias rubens*. Анализировали два типа травмы: 1) прокол стенки тела и 2) обширная кровопотеря. Для идентификации белков использовали метод ВЭЖХ-МАЛДИ tandemной масс-спектрометрии. В ходе анализа было идентифицировано 79 белков. Из них 54 белка имеют сигнальный пептид и являются растворимыми секретируемыми белками; 9 белков несут трансмембранный домен и, вероятно, представляет собой мембранные рецепторы; для 7 белков предсказано ГФИ-заякоривание в мембране; 5 белков относятся к цитоплазматическим белкам; 4 последовательности неполные. Доменный анализ показал наличие 65 типов доменов и 64 уникальных доменных архитектур: 30 однодоменных, 9 двухдоменных и 25 многодоменных архитектур. Наиболее представленными функциональными группами являются ингибиторы протеаз и паттернраспознающие белки. Интересно, что 90–95 % от общего белка целомической жидкости (6–13 мкг/мл) занимают 9 мажорных белков, 4 из которых можно отнести к ингибиторам протеаз. Показано, что травмирование приводит к выраженным качественным и количественным изменениям белкового состава целомической жидкости. Обнаружено 10 белков, появляющихся только после повреждения и одинаковых для обоих типов травмы. В частности, обе травмы приводят к появлению коллагенов и сериновой протеазы, что может указывать на активацию процессов миграции клеток и ремоделирования внеклеточного матрикса. Наличие богатого ассортимента ингибиторов свидетельствует о важности механизмов тонкой регуляции протеолиза в ответе на повреждение.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-04-07798 А). Материал собран на Беломорской биологической станции Зоологического института РАН.

**БЕЛКИ TRPC, Orai И STIM УЧАСТВУЮТ В ФОРМИРОВАНИИ И РЕГУЛЯЦИИ АНСАМБЛЯ ДЕПОУПРАВЛЯЕМЫХ КАНАЛОВ.** © А. В. Шалыгин, А. Ю. Скопин, Д. О. Колесников, А. В. Перевозникова, Л. Н. Глушанкова, Е. В. Казначеева. Институт цитологии, Санкт-Петербург, a\_shalygin@mail.ru

Депоуправляемые каналы являются важным звеном кальциевой сигнализации клеток. Основные белки, участвующие в депоуправляемом входе кальция, это белки STIM, TRPC и Orai. Остается малоизученным следующее: формируют ли белки TRPC и Orai разные каналы или формируют один гетеромерный канал, различается ли регуляция каналов белками STIM1 и STIM2. Нами на клетках линии HEK293 в конфигурации cell-attached были охарактеризованы каналы трех типов:  $I_{ns}$  с проводимостью 5 пСм,  $I_{max}$  с проводимостью 17 пСм и  $I_{min}$  с проводимостью 1.2 пСм. Каналы активировались опустошением кальциевых депо, вызванным добавлением в раствор, омывающий клетки, тапсигаргина — блокатора кальциевых АТФаз эндоплазматического ретикулума. Кальциевые сенсоры эндоплазматического ретикулума белки Stim — это основные регуляторы депоуправляемых кальциевых каналов плазматической мембраны клеток. Для того чтобы разделить вклад белков STIM1 и STIM2 в регуляцию каналов, мы использовали клетки с их оверэкспрессией или нокдауном. В клетках с оверэкспрессией белка STIM1 активировались каналы  $I_{ns}$  и  $I_{max}$ , но не  $I_{min}$ . При оверэкспрессии STIM2 были активны каналы  $I_{min}$  и  $I_{max}$ , уменьшалась доля каналов  $I_{ns}$ . Подавление экспрессии STIM1 уменьшало активность  $I_{max}$ , блокировало  $I_{ns}$  и увеличивало  $I_{min}$ . Снижение уровня экспрессии белка STIM2 блокировало активность  $I_{min}$ , почти не влияло на  $I_{max}$  и не меняло  $I_{ns}$ . Таким образом, мы впервые обнаружили, что белки STIM1 и STIM2 неодинаково регулируют депоуправляемые каналы разных типов.

Белки семейства TRPC, прежде всего TRPC1 и TRPC3, участвуют в регуляции депоуправляемых каналов. Нами было показано, что каналы  $I_{ns}$  содержат белок TRPC3, каналы  $I_{max}$  сформированы белком TRPC1, активность каналов  $I_{min}$  не зависит от этих белков.

Белки семейства Orai тоже формируют депоуправляемые каналы. Результаты опытов продемонстрировали, что белок ORAI необходим для чувствительности каналов TRPC1 к опустошению депо. Эндогенные каналы, состоящие из белков TRPC1, при опустошении депо активируются вслед за входом кальция через каналы ORAI. Однако белки ORAI и TRPC1 не формировали гетеромерного канала.

Таким образом, в клетке существуют депоуправляемые каналы с разным молекулярным составом, которые неодинаково регулируются внутриклеточными белками (STIM1 и STIM2) и белками ORAI. Обнаруженные нами различия в регуляции депоуправляемых каналов разных типов создают основу для создания селективных фармакологических агентов, которые будут модулировать одни депоуправляемые кальциевые каналы и не затрагивать активность других типов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-14-00720П), Российского фонда фундаментальных исследований и Гос. задания.

**МЕХАНИЗМЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПОПУЛЯЦИИ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ КЛЕТОК ЦЕЛОМИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ МОРСКОЙ ЗВЕЗДЫ *ASTERIAS RUBENS*.**  
© Н. С. Шарлаимова, С. В. Шабельников, М. Г. Мартынова, О. А. Быстрова, О. А. Петухова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, petukhova@yandex.ru

Способность взрослых организмов к восстановлению утраченных частей тела и органов наиболее ярко проявляется у представителей иглокожих. Происхождение клеток, вовлеченных в регенеративный процесс, до сих пор остается предметом обсуждений и требует применения новых подходов для решения этой проблемы. Модель исследования — восстановление клеточного пула целомической жидкости (ЦЖ) морской звезды *Asterias rubens* после незначительной или обширной экспериментальной потери ЦЖ.

Низкий уровень пролиферативной активности целомоцитов исключает возможность самообновления целомоцитов и предполагает другие тканевые источники клеток. Наиболее вероятным кандидатом на эту роль является целомический эпителий (ЦЭ). В предыдущих исследованиях в составе ЦЭ и в ЦЖ были выявлены малые клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением без видимых признаков цитодифференцировки, доля которых изменяется в пule циркулирующих целомоцитов после тяжелого травмирования. Особой характеристикой этих клеток являлась способность к пролиферации *in vivo* и *in vitro*. Результаты позволили предположить, что эти клетки являются клетками-предшественниками пula целомоцитов.

В настоящей работе методом трансмиссионной электронной микроскопии выявлена локализация этих клеток в составе ЦЭ и подлежащей соединительной ткани, показана мозаичность строения ЦЭ и подтверждена способность клеток к миграции клеток из состава ЦЭ.

Исследования показали, что в целоме морской звезды присутствуют два пula клеток, различающихся по содержанию отдельных клеточных морфотипов — циркулирующие клетки и клетки, прикрепленные к поверхности ЦЭ. При незначительной травме циркулирующие целомоциты восстанавливаются за счет клеток, прикрепленных к поверхности ЦЭ. При значительной потере ЦЖ в восполнении пula циркулирующих клеток принимают участие прогениторные клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, которые методически выделяются в составе ЦЭ как клетки, слабо связанные с ЦЭ (ЦЭ-С). Этот пул клеток на 50 % обогащен малыми клетками с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением.

Панорамный протеомный анализ белковых экстрактов целомоцитов, ЦЭ и популяции клеток ЦЭ-С, проведенный методом ВЭЖХ-МАЛДИ масс-спектрометрии, показал, что слабо связанные клетки ЦЭ по составу наиболее представленных белков занимают промежуточное положение между целомоцитами и ЦЭ и выявляют присутствие в ЦЭ-С уникальных белков.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (про-

ект 15-04-07798), соответствует Гос. заданию и способствует его выполнению.

**ВЛИЯНИЕ ЦЕНТРОСОМЫ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ НА ДИНАМИКУ МИКРОТРУБОЧЕК НА КРАЮ КЛЕТКИ.**  
© А. С. Шахов,<sup>1</sup> И. Б. Алиева.<sup>2</sup> <sup>1</sup>Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, и <sup>2</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, antshakhov@gmail.com

Центросома является обязательной органеллой животной клетки и выступает в качестве центра нуклеации и организации микротрубочек в интерфазе и митозе. Помимо этого, в специализированных клетках животных и человека центросома выполняет ряд специфических функций. В частности, центросома играет важную роль в обеспечении жизнедеятельности эндотелиальной клетки. Монослои эндотелиоцитов, выстилающий внутреннюю поверхность кровеносных сосудов, служит полупроницаемым селективным барьером для различных макромолекул и форменных элементов крови. Значительный вклад в обеспечение барьерной функции эндотелия вносит цитоскелет, в том числе система цитоплазматических микротрубочек. На модели эндотелиального монослоя *in vitro* мы показали, что центросома располагается преимущественно в геометрическом центре эндотелиоцитов и организует микротрубочки в радиальную систему, т. е. в эндотелиальных клетках большая часть микротрубочек заякорена на центросоме, а число свободных микротрубочек невелико. Система микротрубочек активно вовлечена в реакцию эндотелиальных клеток на повреждающие воздействия химическими агентами (тромбином, нокодазолом и др.), причем деполимеризация периферических микротрубочек является начальным звеном в развитии барьерной дисфункции. Последующее развитие барьерной дисфункции связано с образованием актиновых стресс-фибрилл и сжатием эндотелиальной клетки, приводящее к нарушению межклеточных контактов и образованию дефектов в эндотелиальном монослое. Исследования поведения эндотелия *in vitro* позволили показать, что центросома эндотелиальных клеток способна быстро реагировать на внешние воздействия, отвечая выраженным морфологическим изменениям. В ходе работы был проведен анализ активности центросомы в живых эндотелиальных клетках, результаты которого, возможно, являются одним из свидетельств значительной вовлеченности центросомы в функциональную активность эндотелиальных клеток. Центросома может влиять на количество динамичных концов микротрубочек в районе межклеточных контактов. Для исследования динамики микротрубочек использовали эндотелиальный монослой легочной артерии человека (НРАЕС). Динамику микротрубочек исследовали в живых клетках, экспрессирующих плюс-концевой белок микротрубочек EB3, слитый с GFP. Анализировали среднюю скорость роста плюс-конца для двух типов микротрубочек — тангенциальных (растущих вдоль зоны межклеточных контактов) и радиальных (растущих от центросомы и ориентированных в область межклеточных контактов). Оказалось, что скорость роста плюс-концов радиальных микротрубочек ( $18.00 \pm 0.69$  мкм/мин) превышает скорость роста

плюс-концов тангенциальных микротрубочек ( $16.84 \pm 0.79$  мкм/мин) как для одиночных клеток, так и для клеток, имеющих соседей ( $9.09 \pm 0.43$  и  $7.63 \pm 0.37$  мкм/мин соответственно). Общее количество микротрубочек, радиально растущих от центросомы, превышает количество тангенциальных микротрубочек в обеих анализируемых группах, при этом в клетках, окруженных соседними, радиальных микротрубочек больше, чем в одиночных клетках. Полученные данные свидетельствуют о различиях в одиночных клетках и в клетках, контактирующих с соседними. Таким образом, центросома способна влиять на количество микротрубочек в районе межклеточных контактов, а поскольку динамичные концы микротрубочек взаимодействуют с межклеточными контактами, центросома тем самым вовлечена в регуляцию барьера функции эндотелия.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-04-08550) и программы развития МГУ (PNR 5.13).

HUMAN STEM CELLS FOR *IN VITRO* DISEASE MODELING. © J. C. Schwamborn. Luxembourg Centre for Systems Biomedicine (LCSB), L-4367 Belvaux, Luxembourg.

Research on human brain development and neurological diseases is limited by the lack of advanced experimental *in vitro* models that truly recapitulate the complexity of the human brain. Here, we describe a robust human brain organoid system that is highly specific to the midbrain derived from regionally patterned neuroepithelial stem cells. These human midbrain organoids contain spatially organized groups of dopaminergic neurons, which make them an attractive model for the study of Parkinson's disease. Midbrain organoids are characterized in detail for neuronal, astroglial, and oligodendrocyte differentiation. Furthermore, we show the presence of synaptic connections and electrophysiological activity. The complexity of this model is further highlighted by the myelination of neurites. The present midbrain organoid system has the potential to be used for advanced *in vitro* disease modeling and therapy development.

ЭВОЛЮЦИЯ СИГНАЛОВ ЯДЕРНОЙ И ЯДРЫШКОВОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ. © Е. В. Шеваль. Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова и LIA 1066 LFR2O French-Russian Joint Cancer Research Laboratory, Villejuif, France, sheval\_e@belozersky.msu.ru

За накопление белков в ядре и важнейшем ядерном компартменте — ядрышке — отвечают два типа сигнальных последовательностей. Направленный импорт белков в ядро зависит от взаимодействия сигналов ядерной локализации (NLS) с адаптерными белками кариофелинами, причем этот процесс энергозависим. Накопление некоторых белков в ядрышке опосредуется сигналами ядрышковой локализации (NoLS), которые, как было недавно показано нами, электростатически взаимодействуют с ядрышковыми РНК. В докладе представлены данные о том, что 1) NLS могли предсуществовать в белках прокариот в составе доменов, связывающих нуклеиновые кислоты

или белки; 2) в ходе эволюции некоторые NLS могли оставаться интегрированными в составе функциональных доменов и коэволюционировать вместе с ними; 3) структура некоторых функциональных доменов неядерных белков позволяет им функционировать и как NLS, что требует развития механизмов недопущения импорта этих белков в ядро; 4) любой NLS может автоматически играть роль NoLS при достаточном числе положительно заряженных аминокислот в его составе. Данные проведенного исследования свидетельствуют о том, что сигнальные последовательности (NLS и NoLS) могут эволюционировать параллельно, а также могут быть интегрированы в состав доменов, связывающих нуклеиновые кислоты или белки, коэволюционируя вместе с этими доменами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-54-16001).

СИГНАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ МИОЗИНОВОГО ФЕНОТИПА В ПОСТУРАЛЬНОЙ МЫШЦЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКИ. © Б. С. Шенкман. Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, bshenkman@mail.ru

Для скелетных мышц как на уровне целого органа, так и на уровне отдельных волокон ключевой характеристикой является миозиновый фенотип, т. е. соотношение экспрессируемых быстрых и медленных изоформ тяжелых цепей миозина (ТЦМ). Миозиновый фенотип (т. е. преобладающая изоформа или изоформы ТЦМ) определяет основные функциональные, прежде всего сократительные, характеристики данного волокна и целой мышцы. Известно, что снижение уровня сократительной активности основной постуральной мышцы *m. soleus* в условиях длительного постельного режима, иммобилизации или космического полета приводит к снижению экспрессии медленной изоформы ТЦМ и увеличению экспрессии быстрых изоформ (Stevens, 1999, 2000; Pette, 2003, и др.). В то же время механизмы этого процесса в большой степени остаются неизученными. В последнее время нам удалось несколько продвинуться в понимании физиологической регуляции экспрессии мРНК медленных и быстрых изоформ ТЦМ крысы при использовании стандартной традиционной модели антиортостатического вывешивания животного. В эксперименте с предобработкой животных стимулатором АМФ-активируемой протеинкиназы (АМПК) было показано, что уже в течение первых 24 ч вывешивания наблюдается достоверное снижение экспрессии как предшественника, так и зрелой мРНК медленной изоформы ТЦМ и быстрой изоформы ПА, которое зависит от уровня фосфорилирования АМПК и накопления в ядрах гистондеацетилазы 4 (Вильчинская и др., 2016, 2017). Были получены данные, свидетельствующие о значительном повышении экспрессии мРНК эндогенного ингибитора сигнального пути кальцинейрин/NFAT калькарцина-2 в *m. soleus* крысы в условиях разгрузки на фоне снижения экспрессии мРНК медленного миозина (Шенкман и др., 2014; Lomonosova et al., 2016). Это повышение экспрессии наблюдалось на фоне транслокации Е3-убиквитинлигаз MuRF-1 и MuRF-2 в ядра мышечных волокон (Ломоносова и др., 2015; Lomo-

nosova et al., 2016). Ранее было показано (Moriscot et al., 2010), что экспрессия кальсарцина-2 обусловлена присутствием MuRF-1 и MuRF-2. Нами было также показано, что снижение интенсивности экспрессии медленной изоформы ТЦМ после 7 сут разгрузки наряду с другими факторами обусловлено снижением уровня негативного фосфорилирования и соответственно повышением активности киназы гликогенсинтазы GSK3 $\beta$  как в ядерной, так и в цитоплазматической фракциях, причем это снижение определяется снижением содержания в ткани m. soleus оксида азота, супрессирующего этот фермент (Шарло и др., 2017). Таким образом, получен ряд данных, углубляющих и расширяющих наши представления о механизмах регуляции экспрессии медленных и быстрых изоформ ТЦМ в постуральной мышце в условиях разгрузки. Эти результаты позволили косвенно, а в некоторых случаях и прямо подтвердить нашу рабочую гипотезу о двух основных этапах трансформации миозинового фенотипа при разгрузке — первичного блокирования экспрессии медленного миозина и стабилизации быстрого фенотипа. Однако до сих пор мы не можем представить целостную картину регуляции миозинового фенотипа в этих условиях. Для формирования такой целостной картины даже в качестве рабочей гипотезы необходимо решение ряда частных экспериментальных вопросов. В частности, остается неясным, какие физиологические факторы приводят к дефосфорилированию АМПК на самом раннем этапе гравитационной разгрузки, какова роль в этом процессе изменения соотношения фосфорилированных и гипофосфорилированных адениновых нуклеотидов (АТФ, АДФ и АМФ). Неясно, является ли активность гистондеацетилазы 4 по отношению к гистонам и ключевым транскрипционным факторам событием, лимитирующим экспрессию медленного миозина. Несмотря на большое количество исследований сигнального пути кальцинейрин/NFATc1 в связи с регуляцией экспрессии медленной изоформы ТЦМ, роль NFATc1 в механизмах активации промотора гена медленного миозина остается неясной. Также остаются неясными механизмы, инициирующие повышенную экспрессию эндогенного ингибитора сигнального пути кальцинейрин/NFATc1 кальсарцина-2 при разгрузке.

Исследование проведено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-15-00358).

**ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА НА РАННЕМ ЭТАПЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА G-БЭНДИРОВАНИЯ МЕТАФАЗНЫХ ХРОМОСОМ И МОЛЕКУЛЯРНОГО КАРИОТИПИРОВАНИЯ.** © M. A. Шилина, Н. Н. Никольский, Т. М. Гринчук. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, shili-mariya@yandex.ru

Использование мезенхимных стволовых клеток (МСК) в регенеративной терапии является актуальным направлением развития современной медицины. Однако применение стволовых клеток требует их генетической стабильности и сохранения основных физиологических свойств. В настоящее время нет четких данных о генетической стабильности МСК *in vitro*. Для оценки генетической стабильности клеток в медицинских целях можно использовать различные методы анализа хромосом.

Целью этого исследования было оценить генетическую стабильность 4 линий мезенхимных стволовых клеток эндометрия человека (эМСК) на ранних стадиях культивирования (5—6-й пассажи) с использованием G-бэндинга и молекулярного каротипирования. С помощью метода каротипирования G-бэндированных хромосом были выявлены клетки с нормальным каротипом и пул клеток с хромосомными отклонениями. эМСК 4 линий различались степенью стабильности каротипа. Выявляемые отклонения от нормы были связаны с нарушениями копийности хромосом и хромосомными перестройками (экточеские конъюгации, Робертсоновские транслокации, поломки).

С помощью метода молекулярного каротипирования в линиях эМСК были выявлены микродупликации и потеря гетерозиготности по некоторым хромосомным локусам. Количество хромосом с дупликациями и потерей гетерозиготности было индивидуальным для каждой линии.

По результатам работы можно заключить, что комбинация методов G-бэндирования хромосом и молекулярного каротипирования дает более полные данные о генетическом состоянии клеток в культуре. И при подготовке клеток для медицинских целей целесообразно использование нескольких методов генетического анализа.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской научного фонда (проект 14-50-00068).

**РОЛЬ АНГИОТЕНЗИН II-ЗАВИСИМОЙ АКТИВАЦИИ КАЛЬЦИЕВОГО ВХОДА В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ПОЧЕЧНОГО КЛУБОЧКА ПРИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ НЕФРОПАТИИ.** © Л. С. Шуйский,<sup>1,2</sup> В. В. Левченко,<sup>2</sup> О. Палыгин,<sup>2</sup> Ю. А. Негуляев,<sup>1</sup> Д. В. Илатовская,<sup>2</sup> А. В. Старущенко.<sup>2</sup> <sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия, и <sup>2</sup>Медицинский колледж штата Висконсин, Милуоки, США, leonid.shuyskiy@gmail.com

Подоциты — терминально дифференцированные эпителиальные клетки на поверхности капилляров почечного клубочка, которые играют ключевую роль в фильтрации крови. Повреждения подоцитов часто наблюдаются при сахарном диабете: потеря физиологически активных подоцитов вызывает гломерулосклероз, протеинурию (попадание белка в мочу) и в итоге ведет к диабетической нефропатии (ДН). Причиной уменьшения числа функциональных подоцитов может быть нарушение кальциевого гомеостаза, в частности аномальная активация кальцийпроницаемых ионных каналов семейства TRPC. Известно, что активацию TRPC в подоцитах вызывает, например, ангиотензин II (Анг-II); также показано, что уровень циркулирующего Анг-II повышается при диабете. Целью данного исследования являлся анализ эффектов Анг-II на каналы TRPC6 в модели диабета 1-го типа. Диабет вызывали в крысах линии Dahl SS однократной внутрибрюшинной инъекцией стрептозотоцина (СТЗ) с последующим вживлением подкожного инсулинового имплантата для поддержания умеренной гипергликемии ((300 мг/дл). Мы предположили, что вход кальция, вызываемый Анг-II, может быть усилен в подоцитах в условиях ДН, что в дальнейшем может приводить к гибели этих клеток и протеинурии. В ходе выполнения работы были получены следующие результаты: спустя 11 нед после индукции диабета у экспериментальных жи-

вотных по сравнению с контрольными были выявлены устойчивая гипергликемия, потеря веса и полиурия. Также мы наблюдали увеличение экскреции электролитов, микроальбуминурию и гистологические поражения почки, типичные для пациентов с ДН. Было установлено нарушение регуляции базального уровня кальция в подоцитах свежевыделенных гломерул: увеличение концентрации свободного кальция в подоцитах на 77-й день после инъекции СТЗ составляло  $268.3 \pm 30.9$  нМ, тогда как в контрольной группе уровень был  $131.1 \pm 8.9$  нМ. Обнаружено, что ДН сопровождается повышением притока кальция в ответ на Анг-II; электрофизиологические эксперименты показали увеличение числа активных каналов семейства TRPC ( $1.9 \pm 0.23$  в группе после СТЗ;  $1.25 \pm 0.16$  в контроле). Также наблюдали увеличение вероятности открытого состояния каналов TRPC в ответ на Анг-II у крыс с развитым диабетом:  $0.6 \pm 0.1$  по сравнению с  $0.29 \pm 0.12$  в контрольной группе. Кроме того, встречаемость активных каналов TRPC в экспериментах была выше в подоцитах животных с развитой гипергликемией (45.5%; в контроле — 19.6%). Биохимический анализ показал значительное увеличение уровня белка TRPC6 в кортексе почек при диабете (в  $1.45 \pm 0.08$  раза по сравнению с контрольной группой). Таким образом, в данном исследовании нами получены доказательства того, что Анг-II играет значительную роль в усиении кальциевого входа через каналы TRPC6 при диабете 1-го типа. Представленные результаты открывают новые перспективные направления для изучения терапевтических способов ингибиции каналов TRPC6 в ДН; дальнейшие исследования будут направлены на изучение роли депозависимого кальциевого входа в подоцитах.

#### ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ DLL4-FC НА ХАРАКТЕР ФОРМИРОВАНИЯ ЭНДОТЕЛИОЦИТАМИ СОСУДИСТОЙ СЕТИ В УСЛОВИЯХ IN VITRO. © Н. М. Юдинцева, М. И. Блинова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Кровоснабжение является одним из важнейших и определяющих факторов, необходимых для успешного восстановления поврежденных тканей и органов. В настоящее время клеточные продукты или конкретные соединения, направленные на стимулирование и формирование сосудов при восстановлении поврежденной ткани, отсутствуют. Одним из таких предполагаемых факторов может стать трансмембранный лиганд DLL4-Fc. Известно о его положительном влиянии на формирование сосудистой сети капилляров в модельных системах ретинопатии и ишемии тканей у лабораторных животных (Lobov et al., 2007, 2011). Кроме того, известно, что при совместном культивировании дермальных фибробластов могут оказывать влияние скорость и характер формирования эндотелиоцитами (ЭЦ) сосудистых структур. Однако данные по оценке действия рекомбинантного лиганда DLL4-Fc на культивируемые клетки человека в условиях *in vitro* отсутствуют. Целью работы являлась оценка влияния трансмембранного лиганда DLL4-Fc на характер формирования ЭЦ сосудистой сети при совместном культивировании с дермальными фибробластами (ДФ) в трехмерных условиях. Культивирование ЭЦ выполняли в двух вариантах — на поверхности и внутри коллагенового геля в присутствии (в отсутствие) фибробластов. Введение DLL4-Fc осуществляли непосредственно при приготовле-

нии коллагенового геля (до момента его полимеризации) с концентрацией 100 нг/мл. В качестве контроля использовали культивирование клеток в коллагеновом геле без добавления белка. Сроки культивирования составляли 3 сут. Оценку характера формирования сосудистой сети и фотографирование осуществляли с помощью инвертированного микроскопа Nicon на сроках 1—3 сут. Фотографии были проанализированы с помощью программы Image J. Было показано, что DLL4-Fc оказывает влияние на характер формирования ЭЦ сосудистой сети при культивировании клеток внутри геля, в то время как при культивировании их на его поверхности такого влияния не обнаружено. Кроме того, выявлено различие в характере формирования сосудистых структур при совместном и раздельном культивировании эндотелиоцитов и фибробластов. Полученные результаты позволяют предполагать возможность разработки и создания нового клеточного продукта, направленного на стимулирование и формирование сосудов при восстановлении поврежденной ткани.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-29-04852 офи\_м).

#### ХРОМОСОМНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ЛИНИЯХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ РАЗНЫХ ТКАНЕЙ, НА РАННИХ ЭТАПАХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ. © Т. К. Яковлева, В. И. Турилова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, tyak@incras.ru

Изучение кариотипов мезенхимных стволовых клеток (МСК) человека с целью подтверждения сохранения нормального кариотипа и выявления возможных хромосомных изменений в процессе экспансии *in vitro* необходимо для безопасного применения этих клеток в регенеративной медицине. Постоянно растет число линий МСК, выделенных из разных тканей, и исследований, посвященных оценке их генетической стабильности. В основном МСК *ex vivo* сохраняют нормальный диплоидный кариотип. В то же время в отдельных линиях МСК отмечены разнообразные численные и структурные перестройки хромосом, в том числе и клональные. Не исключается и вероятность злокачественной трансформации МСК в условиях *in vitro*.

Метод дифференциального окрашивания хромосом на G-диски принят в качестве достаточно информативного и обязательного для анализа хромосомной стабильности МСК. К преимуществам этого метода можно отнести возможность поклеточного анализа кариотипов и выявление широкого спектра хромосомных аномалий от анеупloidий и разрывов хромосом до сложных структурных перестроек. Однако вопросы о том, какое количество метафазных пластинок должно быть кариотипировано, какие типы изменений следует отнести к «опасным», являются хромосомные аномалии в МСК случайными или специфичными и какова значимость выявляемых изменений, остаются открытыми.

Представлены результаты анализа кариотипов линий МСК, полученных в Институте цитологии РАН из разных тканей человека: Вартонова студня пупочного канатика двух доноров (MSCWJ-1 и MSCWJ-2), субэпикардиальной жировой ткани двух доноров (МСК СЭЖТ-1 и МСК

СЭЖТ-2), эндометрия (эМСК) и дермальных фибробластов кожи век трех доноров разного возраста (DF-1, DF-2 и DF-3). Цитогенетический анализ с помощью окрашивания хромосом на G-диски выполнен на 6-м пассаже культивирования клеток, за исключением эМСК, кариотип которых анализировали на 2-м пассаже. Кариотипированы 100 метафазных пластинок каждой линии.

Показано, что все клеточные линии сохраняли нормальное диплоидное число хромосом, равное 46, и характеризовались низкой долей полипloidных клеток в популяции от 0.2 (DF-3) до 2.8 (МСК СЭЖТ-1) %. Исключение представляла линия эМСК, в которой обнаружено 5 % полипloidных клеток.

Изменения структуры хромосом встречались с разной частотой в разных линиях и имели различный характер. По типу хромосомных нарушений выделяли хроматидные и хромосомные разрывы, транслокации, делеции, инверсии и комплексные реаранжировки хромосом. При анализе структурных изменений общих для всех линий хромосом и хромосомных локусов не выявлено.

Наиболее стабильный кариотип выявлен в линиях МСК СЭЖТ-1 и МСК СЭЖТ-2, в которых обнаружены 3 и 2 % клеток с разрывами хромосом соответственно. Комплексные структурные перестройки хромосом выявлены лишь в 1 из 100 клеток линии МСК СЭЖТ-2.

Напротив, наиболее высокий уровень хромосомной нестабильности наблюдался в линии эМСК, в которой выявлено 22 % клеток с нарушениями структуры хромо-

сом, включая 20 % клеток с разрывами хромосом и 4 % клеток со структурными перестройками. Скорее всего, эти данные свидетельствуют о непригодности 2-го пассажа для корректной оценки кариотипа эМСК.

Линии дермальных фибробластов, выделенные от разных доноров, также различались по уровню хромосомных аномалий. В клетках DF-1 обнаружены преимущественно реципрокные транслокации (5 % клеток), одна из которых, перестройка обоих гомологов хромосомы 11, оказалась клональной. В клетках DF-3 наряду с транслокациями выявлены разрывы, делеции и инверсии хромосом (12 % клеток). В клетках линии DF-2 структурных перестроек хромосом не обнаружено, но выявлена клетка с числом хромосом 49 (49, XX,+8,+11,+16).

В линии MSCWJ-1 обнаружены две клетки с числами хромосом 47 (47, XX,+2) и 52 (52, XX,+X,+2,+7,+8,+19,+19) и 6 % клеток с разрывами и делециями хромосом. Наконец, в линии MSCWJ-2 обнаружена единственная, но клональная перестройка хромосомы 7 (18 % клеток).

Таким образом, хромосомная нестабильность МСК, по-видимому, связана с адаптацией клеток к условиям *in vitro* и имеет индивидуальный характер, обусловленный как особенностями генома донора, так и типом ткани, из которой выделены МСК. Полученные данные подтверждают важность цитогенетического анализа при разработке критериев оценки безопасности применения МСК в клеточной терапии.