ISSN 0041-3771

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

ЦИТОЛОГИЯ

TSITOLOGIYA

2014. Том 56 9
2014. Vol. 56

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ «НАУКА»

СОДЕРЖАНИЕ

Стр.

Тезисы докладов и сообщений, представленных на XVII Всероссийский симпозиум «Структура и функции клеточного ядра» (Санкт-Петербург, 28—30 октября 2014 г.) 637

Правила для авторов 694

CONTENTS

Abstracts of paper and communications submitted to the XVII All-Russian symposium «Structure and Functions of Cell Nucleus» (St. Petersburg, October 28—30, 2014) 637

Instructions to authors 694

1 Зак. 394

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

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

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

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ МОЛОДЫХ СУБСЕМЕЙСТВ ALUY И МЕТИЛИРОВАНИЯ ИХ ДНК В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА.

© *И. Н. Кабанов*,[1] *Л. И. Тищенко*.[1] [1] Кафедра биохимии биологического факультета С.-Петербургского государственного университета, lnk5@yandex.ru

Alu-повторы — наиболее изученные представители мобильных генетических элементов класса SINE (short interspersed elements — короткие диспергированные элементы) в геноме человека. SINE считываются РНК-полиразой III, а затем их РНК может служить матрицей для обратной транскриптазы, которая закодирована в последовательностях длинных диспергированных повторов LINE. В настоящее время есть основания полагать, что Alu-последовательности и их транскрипты могут играть существенную роль в активации пролиферации, опухолевой трансформации, стрессе и апоптозе. Однако роль Alu-последовательностей и их РНК-продуктов в регуляции внутриклеточных процессов до сих пор не выяснена.

Целью работы являлось исследование взаимосвязи между уровнем экспрессии молодых повторов AluY, уровнем метилирования их ДНК и физиологическим статусом клетки (стадии пролиферации и апоптоза). Объектом исследования служили клетки гистиоцитарной лимфомы U937 и эритромиелобластоидной лейкемии человека K562 на этих стадиях. Апоптоз, вызванный ингибитором топоизомеразы I, камптотецином (CAM), был детектирован по появлению лестничной фрагментации ДНК через 24 и 48 ч обработки.

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

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

ОСОБЕННОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ СИСТЕМЫ СВЕРТЫВАЕМОСТИ КРОВИ ПРИ ТРОМБОФИЛИИ.

© *А. М. Калимагамбетов*,[1] *С. А. Бектемисова*,[1] *Н. К. Дегемерзанова*,[2] *Т.С. Киселева*,[2] *А. Х. Ерденова*.[2] [1] Казахский национальный университет им. аль-Фараби, aitkali.kalimagambetov@kaznu.kz, и [2] Молекулярно-генетическая лаборатория ТОО «Tree Gene», Алматы, Казахстан.

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

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

В ранней диагностике и профилактике тромбофилии одним из этапов является выявление носительства полиморфных генов системы свертываемости крови. При этом практический интерес представляют наиболее распространенные в популяции следующие наследственные тромбофилические состояния: мутации гена *MTHFR C677T* (фермента, играющего ключевую роль в метаболизме фолиевой кислоты), гена фактора V свертывания крови *FV* (*Leiden*), гена фолатного цикла *MTR* и гена протромбина FII *G20210A*, полиморфизм гена *ITGA2*, кодирующего аминокислотную последовательность α2-субъединицы интегринов — специализированных рецепторов тромбоцитов. Следует отметить, что все перечисленные мутации относятся к генному полиморфизму, который заключается в альтернативных вариантах гена (нормальный или мутантный).

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

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

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

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

ВЫСШИЕ УРОВНИ КОМПАКТИЗАЦИИ ХРОМАТИНА В РСС-ХРОМОСОМАХ.

© *Т. А. Карягина*, *В. В. Бураков*, *Ю. С. Ченцов*. Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, vburakov@mail.ru

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

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

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

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

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

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

ЭЛИМИНАЦИЯ МИКРОЯДЕР, ИНДУЦИРОВАННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЕМ ПАКЛИТАКСЕЛА, В КЛЕТКАХ КУЛЬТУРЫ MCF-7.

© *О. П. Кисурина-Евгеньева*, *О. И. Сутягина*, *Г. Е. Онищенко*. Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

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