

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

Таким образом, наши результаты демонстрируют aberrантную 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 ТЕПЛООВОГО ШОКА 90 НА ПЛАЗМАТИЧЕСКУЮ МЕМБРАНУ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК. © М. А. Второва, А. В. Снигирева, О. С. Моренков, В. В. Врублевская. Институт биологии клетки РАН, Пущино, v_vrublevskaya@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 мембране клеток фибросаркомы (HT1080) и глиобластомы (A-172) человека экспрессируются две изоформы Hsp90 — Hsp90 α и Hsp90 β — и что обе изоформы мембранно-ассоциированного Hsp90 участвуют в миграции и инвазии клеток. Целью данной работы было изучение механизмов транслокации Hsp90 α и Hsp90 β 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 мембранно-ассоциированного Hsp90, которое определяется соотношением процесса транслокации на плазматическую мембрану новых Hsp90 из цитозоля и процессов удаления мембранно-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 брэфелдином А и монезином — ингибитором формирования липидных рафтов метил- β -циклодекстрином — и ингибитором лизосомальной секреции хлоридом аммония не приводила к изменению уровня мембранно-ассоциированных Hsp90 α и Hsp90 β . Обработка клеток двумя ингибиторами экзосомальной секреции GW4869 и диметил амилоридом в течение 2 ч снижала уровень двух изоформ мембранно-ассоциированного Hsp90 на 40—60 и 75—80 % соответст-

венно, что свидетельствовало об участии экзосомального пути секреции в транслокации Hsp90 на поверхностную клеточную мембрану. Для подтверждения данного вывода исследовали восстановление уровня мембранно-ассоциированного Hsp90 после обработки клеток гепарином. Ранее мы показали, что обработка клеток гепарином приводит к снижению уровня мембранной экспрессии Hsp90 α и Hsp90 β на 40—80 %. Инкубация клеток, обработанных гепарином, при 37 °С в течение 1 ч сопровождалась полным восстановлением количества мембранно-ассоциированных Hsp90 α и Hsp90 β на поверхности клеток. Брэфелдин А, монезин, метил- β -циклодекстрин и хлорид аммония не влияли на динамику восстановления уровня мембранно-ассоциированных Hsp90 α и Hsp90 β 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 α и Hsp90 β — на плазматическую мембрану опухолевых клеток.

ГЕНЫ РИБОСОМНОЙ РНК В ООЦИТАХ ПТИЦ И РЕПТИЛИЙ. © Е. Р. Гагинская, А. Г. Давидьян, Е. И. Кошель, А. Г. Демин, А. В. Беляев, С. А. Галкина, А. Ф. Сайфитдинова. С.-Петербургский государственный университет, elena.gaginskaya@gmail.com

Растущие ооциты представляют собой высокоспециализированные клетки, в цитоплазме которых аккумулируются и запасаются огромные количества органелл, 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 вторичноротых. 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 (Schjeide, 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 наблюдаемую 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 груп-

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 транскрибируемому спейсеру ITS1 в рДНК курицы и внешнему транскрибируемому спейсеру 3'ETS рибосомного кластера красноухой черепахи. Синтезированные зонды были использованы для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) на криосрезках 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 колина использовали для иммунохимического анализа ядерных структур. Получены результаты, которые вносят существенные коррективы в представления о полной инактивации рибосомных генов в ооцитах половозрелых 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,¹ М. В. Иготти, В. А. Поспелов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ¹olga.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 G₁/S (Abramova et al. 2006, J. Biol. Chem. 281 : 21 040—21 045). Действие ингибитора сборки микротрубочек колцемеида и ингибитора топоизомеразы II этопозиды 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 колцемеидом антипролиферативный эффект усиливался по сравнению с действием агентов без NaBut. Нами была отмечена разница в степени сенсбилизации трансформированных клеток бутиратом натрия к действию этопозиды и колцемеида. Так, усиление бутиратом натрия антипролиферативного действия цитотоксического агента колцемеида было в гораздо меньшей степени, чем усиление клеточной гибели при совместном действии NaBut и этопозиды. Это указывает на реализацию разных путей передачи сигнала в клетке при действии этопозиды и колцемеида 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, репарации 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, Dev. 10 : 1054—1072). Нами было показано, что при действии колцемеида и колцемеида/NaBut происходит сильное накопление белка p53 в ядре клеток E1A+Ras, тогда как при использовании другого агента этопозиды незначительное увеличение пула ядерного p53 происходило только при его совместном администрировании с NaBut. Установлено, что колцемеид вызывал более сильное фосфорилирование белка p53 по остатку Ser-392, чем этопозид. При этом накопление p53, фосфорилированного по Ser-392, индуцированное колцемеидом, выявляется как в ядре, так и в цитоплазме клеток E1A+Ras. Тогда как индуцированное колцемеидом фосфорилирование по Ser-15 белка p53 выявляется исключительно в цитоплазматических экстрактах. Это указывает на активацию проапоптотической активности p53 при действии колцемеида как одного, так и совместно с NaBut.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что цитотоксический агент колцемеид как самостоятельно, так и совместно с NaBut вызывает антипролиферативный эффект в онкоген-трансформированных 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,¹ А. А. Галицына,¹ А. В. Лужин,¹ С. В. Разин,^{1,2} С. В. Ульянов,^{1,2} А. А. Гаврилов.¹ ¹Институт биологии гена РАН, Москва, и ²Московский 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), — C-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-компарментов, 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-