



Хроника и информация

9-е МЕЖДУНАРОДНОЕ РАБОЧЕЕ СОВЕЩАНИЕ «КЛЕТОЧНОЕ ЯДРО/ЯДРЫШКО» (13—17 сентября 1985 г., Краков, ПНР)

Традиционные рабочие совещания «Клеточное ядро/ядрышко» (Nucle(ol)ar Workshop), проводимые под эгидой Европейского общества клеточной биологии, созываются один раз в два года.

Организаторами очередного, 9-го совещания были Академия наук ПНР, Краковский Ягеллонский ун-т и Ин-т онкологии в Варшаве.

В работе симпозиума принимали участие более 100 специалистов из 19 стран мира, в том числе советская делегация в составе: И. Б. Збарский (ИБР АН СССР, Москва), А. В. Алесенко (ИХФ АН СССР, Москва), И. И. Кякнадзе (ИЦиГ СО АН СССР, Новосибирск), О. П. Самарина (ИМБ АН СССР, Москва), В. Н. Парфенов (ИЦ АН СССР, Ленинград), А. П. Белявский (ИМБ АН СССР, Москва), П. Л. Иванов (ИМБ АН СССР, Москва), С. Б. Золотухин (ИМБиГ АН УССР, Киев).

Научные доклады, представленные на совещании в виде лекций и стендовых сообщений, были разделены на шесть секций: 1 — структура ядрышка; 2 — гены ядрышка; 3 — экспрессия генов; 4 — специфические последовательности ДНК; 5 — матрикс; 6 — хроматин.

Секция «Структура ядрышка» (Председатели: К. Сметана (K. Smetana, ЧССР) и М. Бутей (M. Bouteille, Франция). Секция «Гены ядрышка» (Председатели: Р. Ридер (R. Reeder, США) и М. Мураматсу (M. Muramatsu, Япония). Заседания этих секций были открыты докладом М. Гранделенбурга (M. Trendelenburg, Онкологический центр, Гейдельберг, ФРГ), посвященным исследованию ультраструктурной организации транскрипционно активного хромосомного организатора ядрышка. Использование электронной микроскопии ультратонких срезов для прямой визуализации транскрибирующихся генов рРНК в ядрышковых организаторах или других структурах ядрышка до сих пор было невозможно по

следующим причинам: 1) начало транскрипции генов рРНК сопровождается одновременной сложной компартиментализацией ядрышка; 2) в большинстве случаев отношение массы активно транскрибирующихся генов к другим компонентам ядрышка крайне мало. Автор продемонстрировал использование световой микроскопии для детального анализа изолированных ядер из ооцитов домашнего сверчка *Acheta*. Было показано, что этот материал пригоден для приготовления микрообразцов в среде с физиологической ионной силой. На этом же объекте с помощью электронной микроскопии ультратонких срезов исследована общая организация активно транскрибирующихся генов ядрышка. Визуализацию генов проводили, используя контрастную сканирующую электронную микроскопию и технику ультратонких срезов при низких температурах.

Новому методу непосредственного наблюдения активно транскрибирующихся генов рРНК с помощью усиленного светового микроскопа было посвящено сообщение сотрудника этой же лаборатории Г. Шпринга (H. Spring). Техника визуализации транскрибирующегося хроматина с помощью электронного микроскопа (метод О. Миллера) обладает существенным недостатком, заключающимся в необходимости фиксации биологического материала при его подготовке к исследованию. Использование же светового микроскопа для исследования хроматина ограничивается его низкой плотностью и контрастностью, хотя величина транскрибирующихся рибосомных генов достаточна для разрешения в световом микроскопе.

В докладе изложен новый метод прямой визуализации таких генов в нефиксированном, гидратированном состоянии. Для этого использовали световой микроскоп Zeiss Axiomat и компьютерную усиливающую приставку Hamamatsu C1966.

При обсуждении функциональной организации ядрышек большинство авторов использовали схему Г. Гессенса и А. Лепуена (1979), согласно которой в интерфазном ядрышке различают следующие структурные компоненты: фибриллярные центры, соответствующие неактивным рибосомным генам; плотный фибриллярный компонент, окружающий фибриллярные центры и являющийся местом активной транскрипции рДНК; гранулярный компонент, представляющий РНП-частицы, содержащие предшественники рРНК. Анализ этих ядрышковых компонентов были посвящены основные доклады первой секции.

Так, Г. Гессенс (G. Goessens, Ин-т гистологии и цитологии животных, Льеж, Бельгия) и соавт. привели новые доказательства в пользу своей ранее высказанной гипотезы о том, что фибриллярные центры соответствуют неактивной в транскрипции рДНК. Используя сочетание окраски серебром и импульсного включения ³H-уридина, они обнаружили, что плотный фибриллярный компонент ядрышка может быть выявлен не только на периферии, но и внутри фибриллярных центров, за счет чего в них иногда обнаруживается активность РНК-полимеразы I (данные Шира и Роуз, 1984).

Динамическое изменение фибриллярных центров и плотного фибриллярного компонента в лимфоцитах периферической крови человека на разных этапах активации ядрышек после обработки лимфоцитов ФГА было показано в докладе О. В. Зацепиной и К. Сметаны (СССР, ЧССР). Используя метод выявления ядрышковых белков с помощью серебрения на ультратонких срезах, авторы нашли подтверждение гипотезы Г. Гессенса о локализации активных рибосомных генов на поверхности фибриллярных центров.

Изменение функционального состояния рибосомных генов сопровождается морфологическими преобразованиями структуры соответствующих хромосом. Ряд экспериментальных фактов, доказывающих эту взаимосвязь, был приведен в докладе С. Гранцова (С. Grawzow, Ин-т биологии клеток и опухолей, Гейдельберг, ФРГ) «Изменения в активности организатора ядрышка (ОЯ), индуцированные колхицином в культуре асцитных клеток мыши».

Клетки мутантной, колхицинрезистентной линии HD33 в условиях *in vivo* характеризуются единственным крупным активным ОЯ, расположенным на маркерной хромосоме *marAB*. При выращивании клеток в суспензии активировался второй, меньший по размерам, ОЯ на другой маркерной хромосоме *marA₁*. Культивирование суспензии

клеток в присутствии 10⁻⁷ М колхицина сопровождалось увеличением ОЯ на *marA₁*. Постепенное повышение концентрации антибиотика приводило к появлению клеток, резистентных к его концентрации, достигающей 10⁻⁶ М. В таких клетках происходит сильное изменение маркерных хромосом, содержащих ОЯ: *marAB* укорачивается с постепенным уменьшением ОЯ, в то время как *marA₁* становится самой длинной хромосомой в кариотипе. Гибридизация метафазных хромосом *in situ* с клонированной рДНК мыши позволила обнаружить соответствующие изменения в степени амплификации рибосомных генов маркерных хромосом. В отсутствие колхицина описанные изменения имеют обратимый характер. Полученные результаты свидетельствуют об индуцибельном характере изменений числа хромосомных генов под влиянием колхицина и о физической связи в хромосоме рибосомных генов и генов, детерминирующих устойчивость к колхицину клеток опухоли.

Периодическая регрессия и восстановление активности ОЯ в процессе онтогенеза была обнаружена в терминально дифференцированных клетках слюнных желез хиромид. Эти изменения ОЯ коррелировали с подобной же периодической регрессией и восстановлением тканеспецифических пуффов-колец Бальбиани, кодирующих синтез тканеспецифических белков. Указанные изменения контролируются препаратом экизонин и являются основой периодического репрограммирования синтезов в клетках с терминальной дифференцировкой (И. И. Кикнадзе, СССР).

Молекулярные механизмы транскрипции рибосомных генов млекопитающих РНК-полимеразой I были рассмотрены в докладе М. Мураматсу (M. Muramatsu, Токийский ун-т, Япония). Им подробно исследованы участвующие в узнавании РНК-полимеразой I последовательности ДНК, а также белковые факторы, принимающие участие в инициации транскрипции. Изучена структура и предложена модель иницирующего комплекса транскрипции рибосомных генов, согласно которой с промоторной областью гена, кодирующего рРНК, последовательно связываются видоспецифические факторы TF1D, TF1A и РНК-полимераза I. После связывания первых двух НТФ такой «пре-иницирующий» комплекс преобразуется в «иницирующий». Образование последнего лимитируется TF1D и сопровождается гидролизом АТФ и ГТФ. TF1D и TF1A остаются связанными с промоторной областью, в то время как РНК-полимераза I многократно иницирует транскрипцию. Методом точечных мутаций *in vitro* исследова-

на тонкая структура промоторной области клонированной рДНК.

В докладе Р. Ридера (R. Reeder, Онкологический центр, Сизтл, США) подробно проанализированы ДНК-последовательности, выполняющие роль стимуляторов-транскрипции РНК-полимеразой I (так называемые «энхансеры»). Эти последовательности, расположенные в нетранскрибирующихся областях между рибосомными генами, обладают аналогичными функциями с энхансерами структурных генов. Используя клонированную рДНК, было показано, что эти сегменты ДНК функционируют, находясь как с 5'-, так и с 3'-стороны гена либо внутри его, причем независимо от ориентации. Последовательности энхансеров обладают некоторой гомологией с последовательностями промоторных участков РНК-полимеразы I. На основании изложенных данных Р. Ридером была предложена модель функционирования энхансеров, согласно которой эти последовательности служат местами связывания с полипептидами, стабилизирующими комплекс инициации транскрипции.

Анализ последовательности, примыкающей к генам рРНК, был проведен группой авторов из институтов молекулярной биологии Москвы и Софии. С докладом на эту тему выступил О. Георгиев (O. Georgiev, НРБ). Из библиотеки рекомбинантных клонов были выделены гибридные ДНК, которые содержали последовательности, примыкающие к генам рРНК крысы. Определение нуклеотидных последовательностей фрагментов ДНК величиной 5200 н. п., расположенной в 5'-примыкающей области, и 4500 н. п. — в 3'-примыкающей области, позволило сравнить их с ранее опубликованными данными о структурах других кластеров рРНК, в результате чего не было обнаружено значительной дивергенции. Сделан вывод о совместной эволюции всех транскрипционных единиц, кодирующих рРНК. Исследованные прилегающие последовательности содержат сегменты ДНК, многократно повторяющиеся в геноме и включающие последовательность, гомологичную повтору из семейства В2. В прилегающих областях было также показано наличие простых последовательностей и участков с чередованиями пуринов и пиримидинов. Показаны существенные отличия в организации последовательностей спейсеров у млекопитающих по сравнению с низшими эукариотами (*Xenopus*). Обсуждается возможная роль последовательностей спейсеров в регуляции транскрипции генов рРНК и организации структуры хроматина.

Исследование белковых факторов, вовле-

ченных в экспрессию генов рРНК с использованием клонированной рДНК и фракционированного лизата клеток различных тканей, было проведено С. Жакобом (S. Jacob, Медицинский центр, Херши, США). Им было показано, что в клетках гепатомы содержится примерно в 10 раз больше транскрипционно активных молекул РНК-полимеразы I, чем в клетках нормальной печени.

В докладе Дж. Соммервилля (J. Somerville, ун-т Сан-Андрюс, Великобритания) излагались результаты исследований белковых факторов, которые участвуют в регуляции координированной экспрессии генов, кодирующих 5S РНК, тРНК и рРНК. В ооцитах *X. laevis* было идентифицировано два полипептида (*p48* и *p43*), участвующих в стабилизации и внутриклеточном транспорте 5S РНК и тРНК. Участие *p48* в регуляции заключается в его связывании с последовательностью ДНК внутри или в непосредственной близости от гена 5S РНК, в результате чего транскрипция последнего заметно стимулируется. Позитивное влияние на транскрипцию генов тРНК оказывает также и белок *p43*. Кроме того, этот белок связывается с последовательностью гена рРНК, а продукт его протеолиза — *p17* — является белковым компонентом, образующим вместе с 5S РНК пре-рибосомную частицу.

В докладе У. Магера (U. Mager, Амстердамский ун-т, Нидерланды) изложены подходы исследования координированной экспрессии генов рибосомных белков у дрожжей. Автором клонировано и выделено 16 генов, для 15 из них определена нуклеотидная последовательность. Докладчиком выведены общие черты строения исследованных им рибосомных генов: дупликация в хромосомах, наличие в 5'-областях этих генов интронов, а также консервативной последовательности на расстоянии 300—500 н. п. в 5'-прилегающей области генов, так называемого активатора транскрипции.

Идентификация белковых компонентов гранулярных и фибриллярных элементов ядрышка была проведена группой под руководством Г. Буша (H. Busch, Хьюстонский медицинский колледж, США). Они исследовали ядерные фосфопротеины В23 и С23. Определение аминокислотной последовательности этих полипептидов позволило обнаружить области, богатые глутаминовыми и аспарагиновыми кислотами. Используя клонированную укороченную рДНК и клеточные экстракты, изучено влияние этих полипептидов на транскрипцию рДНК. Очищены белковые факторы, стимулирующие инициацию транскрипции в 100—200 раз.

Для исследования функции и локализации

в клетке специфических белков в настоящее время широко используется техника гибридом. Так, например, в докладе Б. Юглы (B. Hugel, Онкологический центр, Гейдельберг, ФРГ) «Рибохарин — специфический ядерный белок частиц — предшественников большой субъединицы рибосомы» было показано использование моноклональных антител к некоторым белкам рибосом и ядрышка для исследования структурной организации ядрышек клеток *X. laevis* и других амфибий. Было показано, что один из кислых ядерных белков с молекулярной массой 40 000, названный авторами рибохарин, специфически ассоциирован с гранулярным компонентом ядрышка и нуклеоплазматическими частицами с коэффициентом седиментации 65S. Эти частицы содержат ядерную 28S рРНК и, по всей видимости, представляют собой предшественников большой субъединицы рибосомы. Методом иммуно-электронной микроскопии рибохарин был локализован в гранулярном компоненте ядрышка в так называемых интерхроматиновых гранулах, которые могут представлять собой транспортную форму частиц-предшественников в нуклеоплазме. Для сравнительных исследований были также использованы моноклональные антитела к самому крупному кислому белку малой субъединицы рибосомы — S1. Этот белок также имеется в пре-рибосомах и локализован в гранулярном компоненте ядрышка. Во время митоза частицы, содержащие как рибохарин, так и S1, ассоциированы с поверхностью сконденсированных хромосом, а в поздней телофазе собираются в реконструирующемся ядрышке. При разрушении ядерной мембраны в период созревания ооцита рибохарин остается ассоциированным с 65S пре-рибосомными частицами и не попадает в рибосомы цитоплазмы. Предполагается, что рибохарин является специфическим компонентом пре-рибосомных частиц, диссоциирующим при созревании этой структуры и многократно утилизирующимся в биогенезе рибосомы.

Р. Танквэй (R. Tanquay, Исследовательский центр Сте-Фои, Канада) использовал моноклональные антитела к основным белкам теплового шока (БТШ) и метод непрямой иммунофлюоресценции для определения функций БТШ в клетках *Drosophila* и млекопитающих. У *Drosophila* БТШ23 синтезируется только после теплового шока и локализуется в цитоплазматических гранулах и в ядрышке. После снятия стресса он перераспределяется в цитоплазме. Подобно этому БТШ70 также аккумулируется в ядрышке и постепенно возвращается в цитоплазму после снятия шока. Если стресс

вызвать другими индукторами, например химическими соединениями, в ядре эти белки не обнаруживаются. В клетках млекопитающих во время теплового шока БТШ 110 также аккумулируется в ядрышке и концентрируется там в специфических районах. Ранее была показана ассоциация БТШ с РНК в ядрышке и индуцированное им ингибирование процессинга рРНК. В докладе обсуждались функции этих БТШ в связи с реорганизацией цито- и ядерного скелета в экстремальных условиях теплового шока.

Секция «Экспрессия генов». Председатели: М. Жакоб (M. Jacob, Франция) и Э. Хидвеги (E. Hidvegi, ВНР). В докладе О. П. Самариной «Организация гена клеточного Т-антигена *p53* в нормальных и опухолевых клетках человека» были представлены результаты исследования ДНК, выделенной из семи различных опухолей кровеносных тканей. В одном препарате (в случае лимфосаркомы) после гидролиза соответствующими рестриктазами обнаружен дополнительный фрагмент, гибридующийся с последовательностью гена *p53*. В ДНК, выделенных из клеток опухолей человека и трансплантированных бестимусным мышам, ген *p53* был также изменен в 5 линиях из 19 исследованных. В двух случаях (саркома почек и меланома) дополнительный фрагмент в геноме был амплифицирован до 10 копий на геном. Методом блоттинга РНК исследовали экспрессию гена *p53* во всех линиях, причем изменений на уровне транскрипции обнаружено не было. В составе вектора *EMBL4* было проведено клонирование гена *p53* из нормальных клеток и измененного амплифицированного гена из карциномы почки. Авторами сделано предположение, что перестройка гена *p53* может приводить к нарушениям в регуляции клеточного цикла, в результате чего начинается конститутивный синтез *p53*, что в свою очередь является причиной трансформации.

Д. Фурнье (J. Fournier, Лаборатория клеточной патологии, Париж, Франция) применил методы гибридизации *in situ* для исследования внутриклеточной локализации геномов вирусов кори и гепатита В в экспериментальных и естественных условиях.

Клонированную ДНК вируса гепатита В (*pCp10*) использовали для исследования экспрессии интегрированного генома вируса в клетках линии гепатомы человека. Показана кинетика появления вирусной РНК в ядрышке, ядре и цитоплазме. В клетках патологической печени, инфицированной вирусом гепатита, наблюдается сходное распределение вирусной РНК.

Исследование роли ядра и отдельных структур ядрышка в репликации вирусной РНК было проведено с использованием в качестве гибридизационного зонда клонированной ДНК вируса кори (*pVP-M*). Взаимодействие вируса с клеточным ядром изучали при персистентной инфекции этим вирусом центральной нервной системы, включая лимфоциты, нейроны и глиальные клетки.

Несколько сообщений, представленных на этой секции, было посвящено исследованию структуры и экспрессии рибосомных генов различных животных. Так, К. Дудов (К. Dudov, Ин-т молекулярной биологии, София, НРБ) рассказал об организации и экспрессии генов трех семейств рибосомных белков мыши (*L32*, *L30* и *S16*). Показано, что каждое семейство состоит из единственного функционально активного и нескольких (от 10 до 15) процессированных псевдогенов. Большинство этих процессированных генов оказалось включенным в геном мыши несколько миллионов лет назад. Этот вывод сделан на основании сравнения значений дивергенции этих последовательностей с последовательностями функциональных генов. Кроме того, у мышей линии *BALB/C* был обнаружен процессированный ген *L32*, не подвергшийся мутациям.

Промоторные области трех исследованных функциональных генов характеризуются длиной пириимидинбогатой последовательностью, перекрывающей сайт экпирования, и отсутствием типичного ТАТА-бокса на расстоянии 20—30 нуклеотидов от этого сайта. Для объяснения этих необычных свойств и определения минимальной последовательности, необходимой для правильной и эффективной транскрипции, был сконструирован ряд делеционных мутантов, а их активность сравнивали с интактным геном. Результаты показывают, что на эффективность экспрессии гена не влияют энхансеры вирусного происхождения, а также другие последовательности, расположенные дальше 36 нуклеотидов в 5'-направлении от сайта экпирования. Несмотря на отсутствие канонического ТАТА-бокса, последовательность между 13 и 36 нуклеотидами перед сайтом экпирования исключительно важна для правильной инициации транскрипции.

Структуру и экспрессию генов рибосомных белков у *X. laevis* исследовал Е. Беккарни (Е. Beccari, Ин-т общей физиологии, Рим, Италия). Им изучена корреляция синтеза рРНК и рибосомных белков в период раннего эмбриогенеза нормальных и безъядрышковых зародышей *X. laevis* и показано, что при отсутствии синтезирующейся рРНК время жизни рибосомных белков и

стабильность кодирующих их мРНК уменьшается. Методом микроинъекций в ооциты была исследована экспрессия клонированных генов, кодирующих два рибосомных белка *L1* и *L14*. Уровни транскрипции и трансляции соответственно гена *L14* и его мРНК пропорциональны дозе гена, в то время как синтез белка *L1* блокируется на уровне сплайсинга его пре-мРНК: последняя сохраняет два небольших интрона. Такой же блок возникает и при синтезе белка *L1* у *X. tropicalis*. Анализ последовательностей интронов генов *L1* этих видов позволил обнаружить консервативные области, принимающие, по мнению авторов, участие в блокировании сплайсинга пре-мРНК.

Исследованию пре-мРНК генов α - и β -глобинов кролика было посвящено сообщение С. Б. Золотухина «Разнонаправленная транскрипция сегмента ДНК, расположенного в 3'-прилегающей области гена $\beta 1$ -глобина кролика». Ранее было показано существование транскриптов α - и β -глобиновых генов кролика дискретной длины, во много раз превышающей расстояние от сайтов экпирования до сайтов полиаденилирования соответствующих генов. В представленной работе проведено картирование 3'-конца одного из таких гигантских транскриптов гена $\beta 1$ -глобина и показано, что его терминация происходит на расстоянии примерно 1300 нуклеотидов за каноническим сайтом полиаденилирования этого гена. Определение нуклеотидной последовательности в этой области позволило обнаружить в непосредственной близости от 3'-конца этого транскрипта канонический гексануклеотид 5'-ААТААА-3', служащий сигналом для специфической РНКазы, расщепляющей первичный транскрипт. Исследованная область расположена в пределах повторяющейся последовательности из Д-семейства, транскрипция которой осуществляется в противоположном направлении. Транскрипция рассматриваемого сегмента хромосомы, таким образом, происходит в противоположных направлениях: слева — направо — в качестве пре-мРНК $\beta 1$ -глобина кролика; справа — налево — в качестве повторяющейся последовательности из Д-семейства.

Механизм образования 3'-концов синтезирующихся мРНК посвящена работа группы авторов, результаты которой были представлены на совещании О. Георгиевым (см. также в 1-й секции) в сообщении «Элементы спейсерной ДНК, необходимые для процессинга и образования 3'-концов мРНК гистона H3 морского ежа». Автором был сконструирован ряд инсерционных и делеционных мутантов клонированного ге-

на гистона H3 морского ежа, транскрипцию которых исследовали в ядрах ооцитов *X. laevis*. Показано, что для процессинга 3'-конца пре-мРНК необходимы: 1) последовательность, участвующая в образовании шпилькообразной структуры на 3'-конце мРНК; 2) последовательность СААГАААГА, расположенная в районе спейсера; 3) последовательности спейсера, прилегающие к 3'-концу СААГАААГА; 4) последовательность АССА, кодирующая 3'-конец мРНК. Увеличение расстояния между палиндромом мРНК и этой последовательностью на 6 нуклеотидов полностью подавляет процессинг. Кроме того, для эффективного процессинга 3'-концов необходимы транскрипты последовательностей, комплементарных U7 нРНК.

Несколько сообщений было посвящено исследованию молекулярных механизмов транскрипции генов РНК-полимеразой II. Так, ранее Хольстом и соавт. (M. Holst, Каролинский ин-т, Стокгольм, Швеция) было показано, что аденозин является селективным ингибитором РНК-полимеразы II в клетках слюнных желез *Chironomus*. В представленной на совещании работе проведено исследование транспорта аденозина и его клеточного метаболизма. Несмотря на высокую скорость транспорта аденозина внутрь клетки, где его концентрация в 10 раз ниже, трансмембранное равновесие никогда не может быть достигнуто из-за высокой эффективности утилизации проникшего в клетку аденозина и его превращения в 2'-АМФ и 3'-АМФ. Впервые описано аномальное внутриклеточное накопление этих продуктов. Показано, что не подвергнутый фосфорилированию аденозин является фактором реакции транскрипции РНК-полимеразой II. При ингибирующих концентрациях аденозина блокируется фосфорилирование негистонового белка с молекулярной массой 42000 — фактора, предположительно участвующего в транскрипции этой РНК-полимеразой. Полученный результат согласуется с гипотезой об ингибирующем влиянии аденозина на синтез гРНК, действие которого заключается в конкуренции за фосфорилирование с некоторыми ядерными факторами, вовлеченными в транскрипцию структурных генов.

В работе, представленной Р. Вейнманном (R. Weinmann, Ин-т анатомии и биологии, Филадельфия, США), «Казеин-киназа II — промежуточное звено в специфическом ингибировании РНК-полимеразы II 5,6-дихлор-1-β-D-рибофуранозилбензимидазолом (ДРБ)» описана казеин-киназа II из клеток *HeLa*, активность которой ингибируется нуклеотидным аналогом ДРБ в концентрациях, используемых для специфического инги-

бирования этим соединением транскрипции *in vivo* и *in vitro*. Аналогичная зависимость наблюдается также и для казеин-киназы II из тимуса теленка, очистку и характеристику которой провели авторы настоящей работы. Бром-производное ДРБ (5,6-дибром-1-β-D-рибофуранозилбензимидазол, ди-Бр-РБ) является более сильным ингибитором транскрипции *in vivo* и подавляет казеин-киназу II и транскрипцию в концентрациях, в 6—10 раз меньших, чем ДРБ. Таким образом, сделан вывод о непосредственном (или опосредованном) участии казеин-киназы II в специфической транскрипции эукариотических генов РНК-полимеразой II.

Секция «Специфические последовательности ДНК». Председатели Р. Хэнкок (R. Hancock, Канада) и С. Шала (S. Szala, ПНР). П. Л. Иванов (СССР) представил доклад о результатах исследования транскрипции повторяющихся последовательностей типа В в геномах грызунов. Из библиотек рекомбинантных клонов, содержащих ДНК, комплементарные мРНК из печени мыши и мозга крысы, выделены клоны, гомологичные высокоповторяющимся последовательностям В1 и В2 генома мыши и неидентифицированным последовательностям генома крысы. Анализ клонов, содержащих ДНК крысы, выявил три различных класса повторов, активно транскрибирующихся в клетках мозга. Было предпринято исследование В1- и В2-содержащих транскриптов из цитоплазмы клеток нормальных тканей и опухолей. Показано, что в цитоплазме присутствуют транскрипты только с одной цепи повторов В1 и В2, в то время как ядерная РНК содержит транскрипты с обеих цепей. Полная копия В2 имеется на 3'-конце мРНК величиной 2000 нуклеотидов, выделяемой из клеток печени и почек. Ее количество значительно увеличивается в регенерирующей печени, однако в клетках гепатомы ее синтез прекращается. С другой стороны, в клетках некоторых видов опухолей количество поли(А)-содержащих мРНК, включающих В1- и В2-повторы, значительно увеличивалось. Сделан вывод о некоординированной транскрипции мРНК, содержащих повторы В1 и В2, и координированном синтезе малых В1 и В2 РНК.

В докладе Е. Шмидта (E. Schmidt, Онкологический центр, Гейдельберг, ФРГ) были представлены результаты исследования рДНК двух подвидов *Chironomus thummi*, где выявлены значительные отличия в длине нетранскрибирующихся спейсеров (НТС). Оказалось, что это обусловлено наличием в НТС *C. t. thummi* большого кластера высокоповторяющейся последовательности ДНК из так называемого семейства С1а-ДНК.

Этот повтор не обнаружен в аналогичном месте у *S. t. piger*. Анализ нуклеотидных последовательностей НТС двух подвидов позволил обнаружить в месте интеграции Cla-ДНК обратный повтор. Cla-элемент был найден не только в НТС, но также в центромерных областях хромосом обоих подвидов и еще примерно в 200 других положениях в хромосомах *S. t. thummi* и *S. t. piger*. Количество копий Cla-элемента коррелирует с величиной геномов исследованных подвидов: больший по размеру геном *S. t. thummi* содержит больше копий Cla-ДНК. Таким образом, Cla-элемент мог участвовать в эволюционном процессе амплификации ДНК.

Д. Филипский (J. Filipiski, Ин-т Жака Моно, Париж, Франция) в докладе «Мозаичная структура геномов позвоночных» представил исследование плавучей плотности ДНК в градиентах хлористого цезия. В этом исследовании обнаружены некоторые закономерности построения геномов позвоночных: ДНК состоит из композиционно связанных гомогенных областей (изохоров), которые могут быть эффективно разделены ультрацентрифугированием. Фракционированную ДНК использовали для изучения методом гибридизации локализации некоторых генов, повторяющихся последовательностей и интегрированных вирусных геномов. Было показано, что исследованные последовательности распределены в геноме не случайным образом в отношении состава молекул ДНК, окружающих их. Анализируя последовательности ДНК, авторы показали, что G+C-состав кодирующих и не кодирующих частей генов, относительная частота динуклеотида CpG и частота использования кодонов зависит от состава протяженных областей ДНК, в которых расположены гены. Такая генная компарментализация, особенно выраженная у теплокровных, влияет на структуру хромосом и, вероятно, отражает отличия в регуляции экспрессии различных классов генов.

Работа Ж. Моро (J. Moreau), сотрудника этого же института, посвящена изучению AT-богатых интронов и экстрагенных спейсеров. Ранее было показано, что в ДНК геномов эукариот часто встречаются AT-богатые последовательности. По распределению в геноме эти последовательности могут быть разделены на два класса: а) основной AT-богатый линкер (АТБЛ) длиной около 1000 н. п., который располагается в геноме примерно через каждые 10000—40000 н. п.; б) кластеры АТБЛ, состоящие из 3—10 членов. Более короткие или менее богатые AT-составом сегменты располагаются в ДНК между АТБЛ. Было показано, что ге-

номные домены α - и β -глобиновых семейств обрамлены с двух сторон АТБЛ, и гены внутри семейств также прерываются короткими АТ-сегментами. Были исследованы также гены, обладающие мозаичной структурой, длина интронов которых составляет несколько тысяч н.п.: клеточные онкогены курицы *c-erbB*, *c-mil* и *c-myb*. Во всех трех случаях исследованные интроны содержат AT-богатые последовательности, которые названы авторами экстра- и интрагенными спейсерами. В некоторых случаях, когда были определены последовательности мест интеграции транспозонов, также были обнаружены сегменты с высоким содержанием АТ.

В этой же работе изучали рекомбинантные клоны, содержащие геномную ДНК в местах интеграции онкогенов вирусов *MH2*, *B77*, *ASV*, *E26*, *MPSV*, *SV40*. Во всех исследованных случаях независимо от вида клетки-хозяина вирусная ДНК интегрирует внутри или в непосредственной близости от АТ-сегмента. Такие области, по-видимому, являются горячими точками интеграции вирусных и транспозонных элементов.

В интересном сообщении М. ван дер Плуга (M. van der Ploeg, Отдел гистохимии и цитохимии, Лейден, Нидерланды) продемонстрирована возможность введения нерадиоактивной метки (флюорохромов) в нуклеиновые кислоты для последующей гибридизации. Разработанные им методы введения метки не оказывают влияния на гибридизацию нуклеиновых кислот; кроме того, меченые зонды стабильны в течение длительного времени. Приведены примеры использования флюорохромов для локализации специфических последовательностей нуклеиновых кислот в клетках или хромосомах, такие, например, как определение специфических вирусных геномов в стимулированных и нестимулированных лимфоцитах.

Секция «Ядерный матрикс». Председатели: Э. Пювион (E. Puvion, Франция), Р. Симар (R. Simard, Канада). Большое внимание на заседании этой секции было уделено различным методам выделения ядерного матрикса. Так, например, в докладе Д. Шейпера (J. Shaper, ун-т Д. Гопкинса, Балтимор, США) подробно проанализирована стратегия получения препаратов интактного ядерного матрикса, в частности последовательность воздействия таких агентов, как ДНКаза, РНКаза, экстракция буферами с различной ионной силой, применение восстанавливающих и окисляющих реагентов. Авторами сделан вывод о том, что для получения сходных препаратов ядерного матрикса следует применять одинаковые методики и строго соблюдать по-

следовательность применения указанных реагентов.

В работе Д. Бувье (D. Bouvier, Лаб. клеточной патологии, Париж, Франция) «Связь ядерных РНК-ассоциированных белков с внутриядерным матриксом клеток *HeLa*» методами электронной микроскопии и двухмерного электрофореза была исследована организация внутриядерных элементов (ядерного матрикса), остающихся после экстракции клеток *HeLa* раствором 2 М NaCl.

Сравнение ультраструктуры и полипептидного состава ядерного матрикса до и после обработки РНКазой показало, что этот материал состоит из двух типов устойчивых к действию NaCl компонентов РНП, одинаково чувствительных к действию РНКаз. Сделан вывод о том, что внутриядерный матрикс клеток *HeLa* состоит из двух элементов, отличающихся содержанием РНК. Один из них является основным компонентом ядрышка. На ультратонких срезах он имеет вид тонкой фибриллярной сети и исчезает из ядер, обработанных РНКазой, вместе с другими основными белками при любых условиях гидролиза. Второй элемент представлен грубыми фибриллами, расположенными вокруг ядрышка. В его состав входят два основных белка с молекулярными массами 49000 и 72000—73000. Сохранение этих фибрилл зависит от присутствия ионов магния во время РНКазной обработки ядер. Обсуждалось значение этих двух элементов, принимающих, по-видимому, участие в прикреплении рРНК и гяРНК к ядерным структурам.

Показано, что многие функции ДНК в клетках эукариот, включая репликацию и транскрипцию, физически связаны с ядерным матриксом. В работе Бибор-Харди и соавт. (V. Bibor-Hardy, Ин-т онкологии, Монреаль, Канада) были изучены механизмы необластической трансформации, индуцированной вирусом герпеса. Авторы, исследуя взаимодействие этого вируса и ядерного матрикса, показали, что большинство событий в жизненном цикле вируса связано с этой клеточной структурой.

В начале литического цикла перед репликацией вирусной ДНК ранние вирусные белки, обладающие регуляторными функциями, ассоциируются с ядерным матриксом и остаются связанными довольно продолжительное время. Синтезирующаяся затем вирусная ДНК также связывается с матриксом, в результате чего она становится более резистентной к действию ДНКаз, чем клеточная ДНК. В период сборки незрелые вирусные капсиды видны под электронным микроскопом связанными с фиброгрануляр-

ной сетью ядрышка. Сделан вывод о том, что ядерный матрикс является местом сборки вирусных частиц и, возможно, участвует в регуляции экспрессии вирусных генов и репликации вирусной ДНК.

Большой интерес на совещании вызвал доклад К. Шеррера (K. Scherrer, Ин-т молекулярной биологии, Париж, Франция) «Просомы: новый класс универсальных, морфологически и биохимически определяемых РНП-частиц, вероятно, участвующих в регуляции экспрессии генов». Просомы — члены нового класса универсальных РНП-частиц, обнаруживаемые во всех исследуемых клетках эукариот. Они обычно состоят из 2—3 молекул низкомолекулярной РНК и примерно 20 белковых субъединиц. Их средняя молекулярная масса составляет примерно 600000 (19S). Они резистентны к действию РНКаз, протеиназы K, 2 М ионов Cs или 1%-ного саркозила. Индивидуальные просомы содержат множество копий одного или нескольких слегка кислых полипептидов с молекулярной массой 20000—35000. Величина популяции таких полипептидов составляет около 25.

Просомы были найдены в цитоплазме как субфракции комплекса, содержавшего репрессированную мРНК глобина. С изменением сложности и специфичности ассоциированной РНК популяция просомных полипептидов, по-видимому, также изменяется. В неактивных мРНК глобинов утки и мыши просомы имеют только по два вида молекул РНК (70 и 90 нуклеотидов), в то время как просомы *HeLa* включают значительно более сложную популяцию низкомолекулярных РНК. Применение специфических моноклональных антител позволило определить антигены просом в ядре и их ассоциацию с хромосомами, матриксом и цитоскелетными структурами на разных стадиях дифференцировки. Биохимический и иммунологический анализы показали выраженную консервативность просомных полипептидов в эволюции, а также их гомологичность низкомолекулярным БТШ. Авторы полагают, что просомы, вовлеченные в репрессирование мРНК *in vivo* и *in vitro*, а также в транспорт РНК и пре-мРНК от хромосомы, участвуют в посттранскрипционном контроле экспрессии генов.

Совместно с лабораторией К. Шеррера исследованием этих мРНП-частиц занимаются в Штутгартском университете (ФРГ). В сообщении Г.-П. Шмида (H.-P. Schmid) «Просомы клеток *HeLa*: субклеточная локализация с помощью моноклональных антител» было показано определенное локализация просом в клетке на различных стадиях созревания мРНК. Для этого использовали

моноклональные антитела к просомному полипептиду с молекулярной массой 27000. Оказалось, что наиболее многочисленно просомы представлены в цитоплазме как субкомпоненты репрессированных мРНК, однако в трансляционно активных полисомах они отсутствуют. Просомы также имеются в ядрышке, но в меньшем количестве.

В докладе И. Б. Збарского (СССР) были представлены данные по изменению синтеза белков ядерного матрикса печени крыс, подвергнутых тепловому шоку. На фоне уменьшения синтеза белков в интактных клетках включение метки в белки матрикса возрастало на 30%. Изменялся профиль белкового спектра за счет уменьшения пиков, характерных для ламин, и увеличения пиков белков с молекулярными массами 100000, 55000, 40000 и 30000.

Сообщение А. В. Алесенко и соавт. (СССР) было посвящено роли сфингомиелина в активности РНК-полимераз, находящихся в контакте с ядерным матриксом. Это сообщение было обсуждено участниками совещания как новый подход в изучении регуляции ферментов транскрипции, связанных со структурами ядерного матрикса.

В стендовом сообщении В. Н. Парфенова (СССР) тремя методами (реакцией с тяжелым меромиозином, иммунофлюоресценцией с моноклональными антителами и родаминофаллоидином) показана связь нитей актиновой сети ооцитов травяной лягушки с кариоскелетом, ядрышковыми фибриллами, РНП-комплексами и порами ядерной оболочки.

Секция «Хроматин». Председатели: И. Б. Збарский (СССР) и В. Хенниг (W. Hennig, Нидерланды). Во втором докладе И. Б. Збарского (СССР) дана характеристика нового явления — высвобождения белков из хроматина после образования одноцепочечных разрывов в ДНК. Первоначально оно было обнаружено на препаратах минихромосом вируса SV40, где минихромосомы, обладавшие транскрипционной активностью и находившиеся под торзионным напряжением, после образования одноцепочечных разрывов теряли ассоциированные гистоны. При обработке подобным образом ядер, выделенных из мышечных клеток, около 10% ДНК теряло ассоциированные белки, в том числе гистоны, НМГ-белки и другие негистоновые белки. Эта ДНК содержала значительную часть новосинтезированных транскриптов, устойчивых к действию РНКаз. Поскольку для проявления эффекта достаточно внести лишь небольшое количество одноцепочечных разрывов, а к высвобождению белков приводит действие самых разных химических агентов, высказывается

предположение, что высвобождение белков происходит вследствие релаксации хромосомных ДНК.

Доклад А. В. Белявского (СССР) был посвящен исследованию взаимодействия негистоновых белков НМГ14 и НМГ17 с нуклеосомами. Показано, что расположение гистонов вдоль нуклеосомной ДНК при связывании НМГ14 и 17 не меняется. НМГ14 и 17 связывается четырьмя участками в концевых областях нуклеосомной ДНК: непосредственно с 3'- и 5'-концами ДНК и на расстояниях около 25 и 125 нуклеотидов от 5'-концов. Центральная область нуклеосомной ДНК остается свободной от взаимодействия. Участки 25 и 125 расположены друг против друга через малую бороздку ДНК и подобно гистонам НМГ14 и 17 в этих участках локализованы на внутренней стороне ДНК в нуклеосоме. Белки НМГ14 и 17 связываются с минимальными Н1- и Н5-содержащими нуклеосомами сходным образом.

Доклад У. Шира (U. Scheer, Онкологический центр, Гейдельберг, ФРГ) посвящен электронно-микроскопическому исследованию процессов транскрипции в хромосомах типа «ламповых щеток» амфибий. Латеральные петли таких хромосом являются местами высокой транскрипционной активности. При действии на ооциты амфибий актиномицина D латеральные петли постепенно уменьшаются в размерах и конденсируются в хромосомах. Эта индуцированная актиномицином D конденсация петель является полностью обратимым процессом, так как после снятия действия антибиотика петли начинают увеличиваться и достигают прежних размеров. Авторы предлагают два возможных механизма конденсации петель при прекращении синтеза РНК: 1) за счет конденсации ДНК в хромосомную ось количество ДНК в данной петле уменьшается; 2) содержание ДНК в петле остается постоянным, т. е. последовательности в основании петли остаются фиксированными, но хроматин петли упаковывается в структуру более высокого порядка. Последнее предположение авторы доказали методом иммунофлюоресцентной микроскопии с использованием моноклональных антител к ДНК, а также с помощью электронной микроскопии ультратонких срезов. Полученные данные указывают на то, что латеральные петли хромосом типа «ламповых щеток» амфибий организованы в определенные домены ДНК, а наблюдаемые изменения размеров обусловлены различными способами упаковки ДНК в структуре хроматина.

Кроме описанных заседаний, на совещании была проведена дискуссия за круглым столом, организованная К. Шеррером, на

которой обсуждались следующие вопросы: связь активности и экспрессии генов с морфогенезом; детерминированность локализации ядрышка, хромосом, генов (клеточных и вирусных), мРНК, а также топологию ядра в целом; механизм организации во времени и пространстве разнообразных ядерных функций на основе ядерного матрикса.

Таким образом, основными направлениями в исследованиях клеточного ядра в настоящее время являются: изучение функциональной активности ядерного матрикса, включая его участие в развитии вирусной инфекции и активации онкогенов, в процессах репликации и транскрипции; исследо-

вание структуры белков фиброзного слоя ядерной оболочки (ламин) и их значение в организации хроматина; изучение тонкого строения и регуляции экспрессии генов, в частности генов рРНК и белков рибосом; характеристика отдельных негистоновых белков ядра и ядрышка; изучение динамической структуры клетки с применением комплексных подходов, включающих электронно-микроскопические и биохимические методы исследования.

Следующее, 10-е, совещание будет проведено в 1987 г. в Нидерландах, а 11-е (в 1989 г.) — в СССР.

С. Б. ЗОЛОТУХИН