

М.А. СОБОЛЬ¹, Е.Л. КОРДЮМ¹,
Ф. ГОНСАЛЕС-КАМАЧО²,
В. РОДРИГЕС-ВИЛАРИНЬО², Ф.Х. МЕДИНА²

¹ Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, Киев
E-mail: margaret_sobol@yahoo.com; cell@svitonline.com

² Центр биологических исследований, Мадрид, Испания
E-mail: fjmedina@cib.csic.es

ИЗМЕНЕННАЯ ГРАВИТАЦИЯ ВЛИЯЕТ НА СУБЪЯДРЫШКОВУЮ ЛОКАЛИЗАЦИЮ ФИБРИЛЛАРИНА И NorA64, ВАЖНЕЙШИХ БЕЛКОВ ПРОЦЕССИНГА рРНК



*Фибрилларин и растительный гомолог нуклеолина NorA64 являются двумя важнейшими ядрышковыми белками, участвующими в процессинге пре-рРНК. Для понимания эффектов, оказываемых измененной гравитацией на функционирование ядрышка, мы исследовали локализацию фибрилларина и NorA64 в ядрышковых субкомпонентах меристематических клеток корней проростков кресс-салата (*Lepidium sativum* L.), выросших в условиях симулированной микрогравитации, и сравнили ее с контрольной в клетках, выросших в нормальных условиях, при 1g. Впервые показано, что фибрилларин кресс-салата имеет молекулярную массу 41 кДа. Фибрилларин и NorA64 в ядрышках клеток кресс-салата локализируются в зонах, которые содержат процессирующие молекулы пре-рРНК, как было предварительно показано для других видов, что подтверждает участие этих белков в рибонуклеопротеиновых комплексах частицах, задействованных в процессинге пре-рРНК-процессах. В условиях измененной гравитации мы впервые показали уменьшение количества как фибрилларина, так и NorA64 в переходной зоне между фибриллярными центрами и плотным фибриллярным компонентом по сравнению с контролем, что может указывать на снижение уровня раннего процессинга пре-рРНК в экспериментальных условиях. Подобное уменьшение содержания фибрилларина и NorA64 было выявлено и в плотном фибриллярном компоненте, что, вероятно, свидетельствует о снижении уровня процессинга пре-рРНК и на последующих этапах. Полученные нами данные позволяют впервые предположить, что измененная гравитация (клиностатирование) вызывает снижение уровня функциональной активности ядрышка.*

© М.А. СОБОЛЬ, Е.Л. КОРДЮМ, Ф. ГОНСАЛЕС-КАМАЧО,
В. РОДРИГЕС-ВИЛАРИНЬО, Ф.Х. МЕДИНА, 2005

Введение. Многочисленные космические и наземные эксперименты, моделирующие, до известной степени, различные факторы реального полета, позволили сделать вывод, что основным, постоянно действующим фактором является микрогравитация [1]. Выявленные в условиях микрогравитации изменения метаболизма и структуры клеток, не специализированных к восприятию гравитации, позволили сделать фундаментальное открытие гравичувствительности растительной клетки [2]. Многочисленные работы описывают перестройки ультраструктуры и функционирования клеточных органелл под влиянием микрогравитации [2–5], однако только несколько публикаций касаются поведения ядрышка в условиях измененной гравитации [6–8].

Ядрышко является специфическим регионом ядра, где происходит синтез и процессинг рибосомальной РНК [9–11]. Степень функциональной активности ядрышка отражает уровень клеточного метаболизма [12]. В результате транскрипции рибосомальной ДНК (рДНК) в ядрышке синтезируется множество копий молекулы — предшественника рибосомальной РНК (пре-рРНК), которая затем процессируется, т.е. специфически расщепляется с образованием равного количества 28S-рРНК, 18S-рРНК и 5,8S-рРНК, являющихся компонентами рибосом вместе с 5S-рРНК, которая имеет внеядрышковое происхождение. Различные белки, такие как фибрилларин, нуклеолин, GAR1, SSB1, и малые ядрышковые рибонуклеиновые кислоты (мядРНК), такие как U3, U8, U13, U14, U15, U22, NAP57, как известно, участвуют в процессинге пре-рРНК, формируя РНП-комплексы, называемые «процессомами» [13]. В частности, фибрилларин и нуклеолин являются двумя из наиболее важных и хорошо изученных белков ядрышковых процессом. Фибрилларин — консервативный белок, основными характеристиками которого является наличие домена, обогащенного глицином и диметиларгинином (GAR домен), и домена, распознающего РНК (RRM домен), а также способность ассоциироваться с U3 мядРНК для участия в процессинге пре-рРНК [14–19]. Анализ аминокислотной последовательности нуклеолина выявил присутствие трех различных структурных доменов [20]. N-терминальный домен состоит из сильноокислых регионов, которые перемежаются основными последовательностями [21–23]. Цен-

тральный домен содержит от двух до четырех RRM, придающих белку РНК-связывающую специфичность [24–28]. С-терминальный домен, являющийся GAR доменом, облегчает взаимодействие RRM доменов с мишенями, локализованными на большой и комплексной пре-рРНК [28–30]. В растениях было описано несколько гомологов нуклеолина или нуклеолин-подобных белков, один из которых, найденный в меристематических клетках лука, был назван NorA64 [31].

Выделить единичные функциональные этапы биосинтеза рибосом в ядрышке довольно сложно из-за высокой степени компактизации и упаковки различных макромолекул, участвующих в этом процессе. Проблема усложняется, когда клетка подвергается воздействию внешних факторов, включая измененную гравитацию. Решение этой проблемы, несомненно, необходимо и важно, если мы хотим знать, как проходят различные стадии рибосомного биогенеза и на какой этап в этом комплексном процессе влияет микрогравитация. Локализация и количество фибрилларина так же, как и растительного гомолога нуклеолина NorA64, в ядрышковых субкомпонентах могут быть использованы для характеристики процессинга рРНК, уровень которого является одним из показателей функциональной активности ядрышка. Основное внимание в наших исследованиях мы уделили функционированию ядрышка растительной клетки в условиях измененной гравитации. Мы использовали медленное горизонтальное клиностамирование, которое частично воспроизводит некоторые биологические эффекты реальной микрогравитации [32–34].

Материалы и методы. *Растительный материал.* Семена кресс-салата (*Lepidium sativum* L.) были помещены в 1%-ный агар в пробирки диаметром 30 мм и высотой 100 мм. Семена были ориентированы зародышевым корнем вниз. Семена кресс-салата проращивали в стационарных условиях и на медленном горизонтальном клиностате (2 об/мин). Проростки росли в темноте на протяжении двух дней. Кортикальные клетки меристемы корней исследовали с помощью флуоресцентной и электронной иммуноцитохимии, для иммуноблоттинга использовали корневые меристемы полностью. Как известно, ядрышко, являясь частью ядра, связано с клеточным циклом, изме-

няя некоторые свои характеристики; для исключения этого дополнительного фактора мы анализировали достаточно большое количество образцов во всех наших экспериментах.

Антитела. Моноклональные антитела к фибрилларину были любезно предоставлены профессором Э.К.Л. Чаном (Центр аутоиммунных заболеваний, Калифорния, США). Реакция этих антител с фибрилларинном лука описана ранее [35]. Было использовано разведение 1:5 для флуоресцентной и электронной иммуноцитохимии и 1:100 для иммуноблоттинга. Поликлональные антитела к NorA64 выращивали в кроликах против полного белка из клеток лука, имеющего иммунологические детерминанты, подобные животному ядрышковому белку нуклеолину [31]. Для электронной иммуноцитохимии использовали разведение 1 : 5. В качестве вторичных антител для антител к фибрилларину использовали козью сыворотку против иммуноглобулинов IgG мыши, разведенную в соотношении 1 : 50 для флуоресцентной и электронной иммуноцитохимии и в соотношении 1 : 5000 для иммуноблоттинга. Для антител к NorA64 в качестве вторичных антител была использована козья сыворотка против иммуноглобулинов IgG кролика, разведенная в соотношении 1:50 для электронной иммуноцитохимии. Все вторичные антитела поставлены фирмой «Sigma». Вторичные антитела были конъюгированы с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) для иммунофлуоресцентной микроскопии, с частицами золота диаметром 10 нм для ультраструктурной иммуноцитохимии и с пероксидазой для иммуноблоттинга.

Иммуноблоттинг. Ядра кресс-салата выделяли из корневых меристем, отделенных от растений. Для этой цели были использованы 1100 проростков. Процедура описана ранее для меристематических клеток лука [15, 31] и использовалась для клеток кресс-салата с некоторыми модификациями. Ядерные белки фракционировали по их растворимости, следуя ранее описанному методу [15, 31]. Белки экстрагировали сначала в этилендиаминтетраацетатном (ЭДТА) буфере низкой ионной силы (1 mM ЭДТА, 10 mM Tris-HCl), получая так называемую «фракцию S2». Осадок затем обрабатывали ДНКазой; ДНК экстрагировали 0,25 M сульфатом аммония, получая «фракцию хроматина». Добавляя 4 M NaCl к осадку, мы экстрагировали белки «вы-

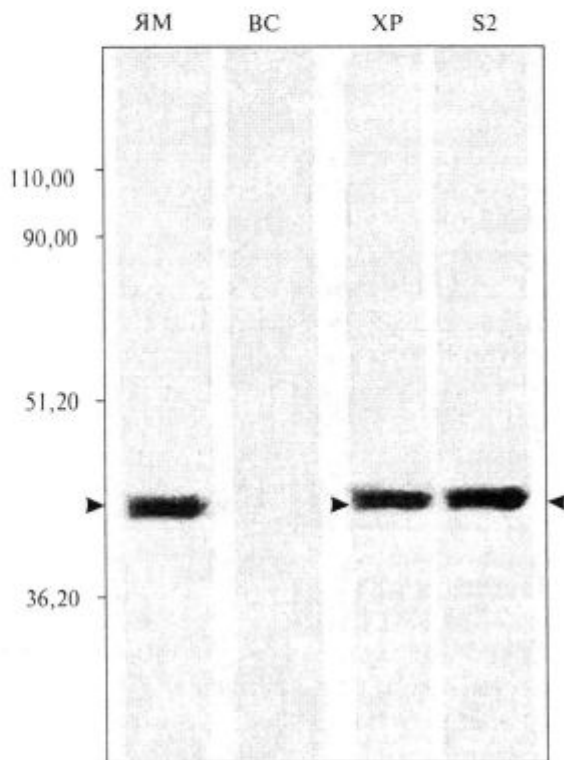


Рис. 1. Иммуноблоттинг фибрилларина во фракциях белков из ядер меристематических клеток корней проростков кресс-салата: ЯМ — фракция ядерного матрикса; ВС — фракция белков, растворимых при высоких концентрациях солей; ХР — фракция белков, ассоциированных с хроматином; S2 — растворимая фракция. Количество белков, использованное в каждом треке, составляет 15 мкг. Головки стрелок указывают полосы фибрилларина. Стандарты молекулярных масс в кДа даны слева

сокосолевой фракции». Наконец, нерастворимые белки, составляющие «фракцию ядерного матрикса», экстрагировали с помощью инкубации в 8 М мочеvine, обработки ультразвуком и осаждения в 7%-ной трихлоруксусной кислоте (ТХУ). Во всех процедурах использовали смесь ингибиторов протеаз. Белки каждой ядерной фракции были подвергнуты электрофоретическому разделению в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE), а затем электротрансферированы на поливинилиден дифлюоридные (PVDF) мембраны («Schleicher & Schuell», Дассель, Германия). Мембраны инкубировали с антителами к фибрилларину по методике, описанной ранее [15]. Блоты проявляли с использованием кита ECL, повышающего хемилюминесценцию («Amersham International», Великобритания), сканировали и анализировали ден-

ситометрически на денситометре «BioRad» с помощью программы «Image Quant».

Иммунофлюоресценция. Иммунофлюоресценцию проводили на давленных препаратах меристем. С этой целью было взято 100 проростков. Мы использовали методику, описанную ранее [36], с нашими модификациями. Меристемы фиксировали в 4%-ном параформальдегиде (PFA) и раздавливали после обработки клеточных стенок смесью ферментов. Препараты, пермеабиллизированные в 10%-ном Nonidet-P40 и 5%-ном деоксихолате натрия, инкубировали последовательно в 2%-ном альбумине бычьей сыворотки (BSA), в первичных и вторичных антителах, затем окрашивали 4',6-диамидин-2-фенилиндолом (DAPI) и заключали в Mowiol, уменьшающий потерю флюоресценции. Контроль мечения проводили, опуская инкубацию в первичных антителах. Препараты исследовали в конфокальном лазерном сканирующем микроскопе («Leica», Германия) при длине волны возбуждения 488 нм для детекции FITC и 358 нм для детекции DAPI; иммерсионный объектив $\times 63$.

Электронная иммуноцитохимия. Корни кресс-салата фиксировали в смеси 4%-ного формальдегида с 0,5%-ным глютаральдегидом в фосфатном буфере PBS, pH 7,2 на протяжении 2 ч при комнатной температуре. С этой целью было взято 30 контрольных и 30 клиностатирированных проростков. Меристемы отделяли от корней лезвием во время промывки в PBS, затем дегидратировали в этаноле повышающейся концентрации и заключали в акриловую смолу LRWhite. Ультратонкие срезы толщиной 70–80 нм монтировали на покрытых формваром никелевых сетках и инкубировали последовательно в 2%-ном BSA, в первичных и вторичных антителах согласно ранее описанной процедуре [15] с нашими модификациями [37]. Контроль мечения проводили, опуская инкубацию в первичных антителах. Сетки окрашивали 2%-ным водным раствором уранилацетата и исследовали в трансмиссионном электронном микроскопе Philips EM300 при 80 кВ. Плотность мечения над ядерными структурами и субъядрышковыми компонентами вычисляли, используя программу «QWin Standard» («Leica», Германия) для автоматического анализа изображений. С этой целью определяли относительную площадь каждого компартмента, считали количество частиц золота

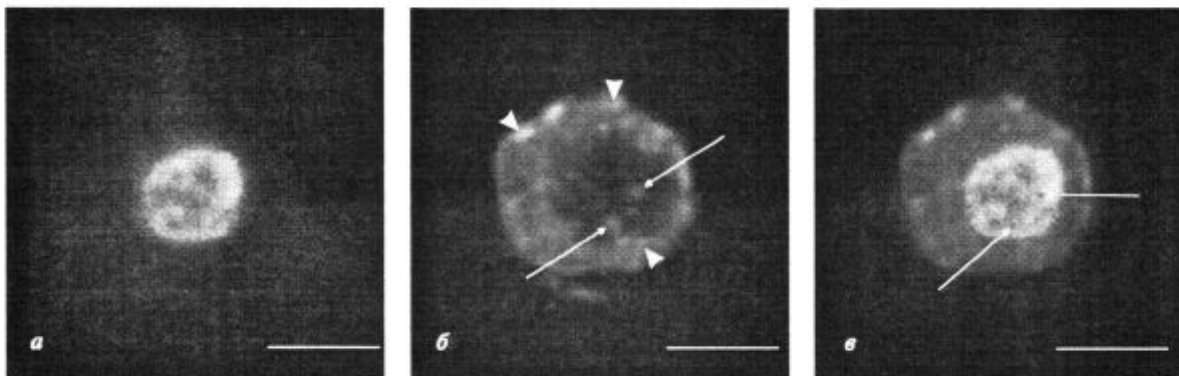


Рис. 2. Одновременная локализация фибрилларина после реакции с антителами к фибрилларину и вторичными антителами, конъюгированными с FITC, и ДНК после реакции с DAPI на одном и том же единичном оптическом срезе, полученном с использованием конфокальной лазерной сканирующей микроскопии: *а* — детекция фибрилларина; *б* — детекция ДНК; *в* — изображение, полученное в результате виртуального слияния рисунков *а* и *б*. Стрелки указывают фибриллярные центры ядрышка, выявленные реакцией с DAPI, на рис. 2, *б* и зоны, лишённые мечения, в которых локализованы гетерогенные фибриллярные центры, на рис. 2, *в*. Головки стрелок указывают кластеры конденсированного хроматина ядра. Масштабный отрезок равен 4 мкм

над компарментом и вычисляли плотность мечения как отношение числа частиц золота к относительной площади. Мы рассматривали два функционально различных ядрышковых структурных домена, а именно «фибриллярные центры и переходная зона между фибриллярными центрами и плотным фибриллярным компонентом» (ФЦ + переходная зона ФЦ-ПФК) и плотный фибриллярный компонент (ПФК). Первый домен был автоматически определен постоянным расстоянием 10 нм от границ фибриллярных центров [36]. Проанализировано 25 электронных микрофотографий для каждого варианта.

Результаты исследований. Идентификация фибрилларина во фракциях ядерных белков и его локализация в меристематических клетках корней проростков кресс-салата. Фибрилларин был идентифицирован во фракциях ядерных белков

из меристематических клеток корней кресс-салата с помощью SDS-PAGE и иммуноблоттинга с антителами к фибрилларину (рис. 1).

Отдельные единичные полосы были распознаны антителами в трех из четырех фракций ядерных белков, а именно в наиболее растворимой фракции S2, фракции белков, ассоциированных с хроматином, полученной после ферментативного расщепления ДНК, и наиболее нерастворимой фракции белков ядерного матрикса. Так называемая «высокосолевая» фракция, предположительно содержащая белки ядерного скелета, растворимые при высоких концентрациях солей, по-видимому, не содержала фибрилларин. Во всех трех фракциях фибрилларин мигрировал в гелях с очевидной молекулярной массой 41 кДа, показав очень незначительные флуктуации (табл. 1). Однако не все фракции показали одинаковый уровень белка. Фракция S2 была обогащена фибрилларин, а фракция хроматина и фракция ядерного матрикса содержали меньшее количество этого белка согласно оптической плотности соответствующих полос (табл. 1).

Иммунофлуоресцентная детекция фибрилларина с использованием антител к фибрилларину и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии выявила яркую флуоресценцию ядрышка. Однако ядрышко в целом не было равномерно окрашено, флуоресцентное мечение оказалось сконцентрированным в отдельных зонах, при

Таблица 1

Количественный анализ полос, выявленных в иммуноблотах после реакции с антителами к фибрилларину в различных фракциях ядерных белков

Фракция	Молекулярная масса, кДа	Оптическая плотность
Растворимая (S2)	41,04	1,935
Хроматина	41,38	1,334
Нерастворимая (ядерного матрикса)	40,36	1,415

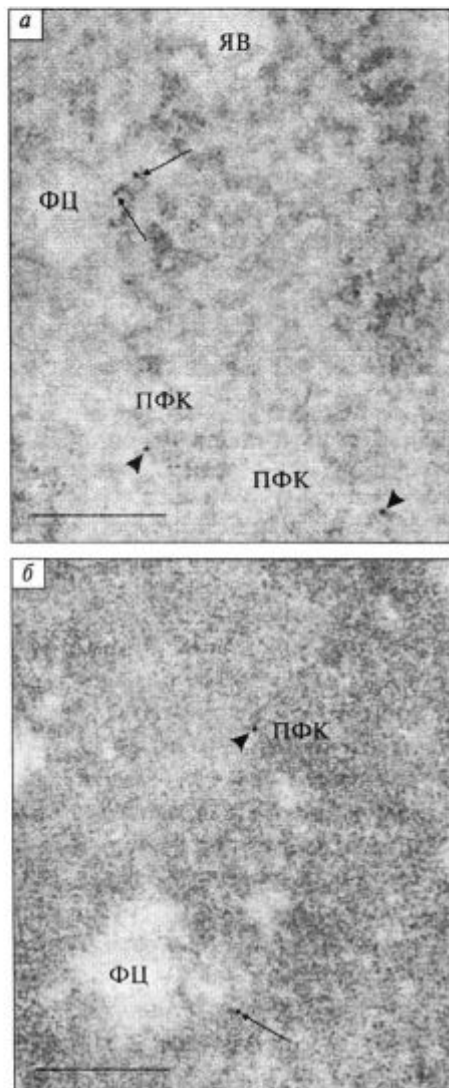


Рис. 3. Иммуноцитохимическая локализация фибрилларина в ядрышках меристематических клеток кресс-салата: *a* — контроль; *b* — измененная гравитация; ФЦ — фибриллярный центр; ПФК — плотный фибриллярный компонент; ЯВ — ядрышковая вакуоль. Стрелки указывают мечение переходной зоны ФЦ-ПФК. Головки стрелок указывают мечение плотного фибриллярного компонента. Масштабный отрезок равен 1 мкм

этом некоторые области были лишены флюоресценции (рис. 2, *a, в*).

Детекция ДНК после реакции с DAPI визуализировала умеренно окрашенные зоны диффузного хроматина ядра, а также яркие кластеры ядерного конденсированного хроматина и гетерогенных фибриллярных центров ядрышка (рис. 2, *б*). Гетерогенные ядрышковые ФЦ, выявлен-

ные DAPI, были локализованы в темных зонах, не содержащих метки антител к фибрилларину, но окруженных ярко флюоресцирующими областями, содержащими фибрилларин. Тонкие филаменты деконденсированной ДНК, соединяющие фибриллярные центры друг с другом и с хроматином ядра, были погружены в эти яркие флюоресцентные зоны (рис. 2, *в*).

Локализация фибрилларина в ядрышках при 1g и в условиях клиностатирования. Фибрилларин в контроле с использованием электронной иммуноцитохимии с антителами к фибрилларину был локализован в ядрышке. Частицы золота выявлены на периферии фибриллярных центров, т.е. в переходной зоне ФЦ-ПФК, и в плотном фибриллярном компоненте (рис. 3, *a*).

По результатам количественного анализа распределения частиц золота в ядрышковых субкомпонентах переходная зона ФЦ-ПФК оказалась наиболее меченым доменом, в то время как плотный фибриллярный компонент показал значительно меньшую плотность мечения (табл. 2).

В условиях измененной гравитации мечение антителами к фибрилларину с использованием электронной иммуноцитохимии также показало специфическую ядрышковую локализацию. Как и в контроле, частицы золота были выявлены на границе между фибриллярными центрами и плотным фибриллярным компонентом и в самом плотном фибриллярном компоненте (рис. 3, *б*). Количественный анализ распределения частиц золота показал, что отношение между мечением переходной зоны и мечением плотного фибриллярного компонента было весьма сходным в контроле и при клиностатировании — плотность метки была в 5 раз выше в переходной зоне ФЦ-ПФК (табл. 2). Это указывает на то, что

Таблица 2

Количественный анализ распределения метки антител к фибрилларину в ядрышке при 1g и в условиях клиностатирования

Показатель	Количество гранул золота/мкм ²	
	ФЦ + переходная зона ФЦ-ПФК	ПФК
Контроль	8,10 ± 2,35	1,56 ± 0,24
Измененная гравитация	2,52 ± 0,66*	0,50 ± 0,18***

Примечание. Среднее ± стандартное отклонение, *p < 0,05, ***p < 0,001.

измененная гравитация не влияет на специфичность мечения антителами к фибрилларину, т.е. локализацию *in situ* этого ядрышкового белка. Тем не менее плотность мечения значительно различалась в опытном и контрольном вариантах. Условия клиностаტიрования вызвали значительное снижение уровня фибрилларина, иммунологически локализованного в ядрышке, в двух ядрышковых структурных доменах, в которых он присутствовал. В условиях измененной гравитации количество метки уменьшалось в 3 раза по сравнению с мечением в контроле (табл. 2).

Локализация гомолога нуклеолина NorA64 в меристематических клетках в стационарных условиях и под влиянием измененной гравитации. В контрольных клетках с использованием электронной микроскопии мечение антителами к NorA64 было локализовано в ядрышке. Метка была выявлена в фибриллярных центрах и плотном фибриллярном компоненте. Фактически большая часть метки была локализована в переходной зоне ФЦ-ПФК (рис. 4, а). Согласно количественному анализу распределения частиц золота в ядрышковых субкомпонентах фибриллярные центры и переходная зона ФЦ-ПФК были мечены антителами к NorA64 значительно больше, чем плотный фибриллярный компонент (табл. 3).

В условиях измененной гравитации мечение антителами к NorA64 было также специфичным для ядрышка и, внутри него, для фибриллярных центров и плотного фибриллярного компонента (рис. 4, б). Количественный анализ показал, что, как и в случае с фибрилларинном, содержание NorA64 в ядрышковых субкомпонентах, детектируемое мечением антителами, было ниже в условиях клиностаტიрования по сравнению с

Таблица 3

Количественный анализ распределения метки антител к NorA64 в ядрышке в контроле и в условиях измененной гравитации

Показатель	Количество гранул золота/мкм ²	
	ФЦ + переходная зона ФЦ-ПФК	ПФК
Контроль	9,99 ± 1,48	6,71 ± 1,20
Измененная гравитация	5,32 ± 1,40*	1,40 ± 0,40***

Примечание. Среднее ± стандартное отклонение, **p* < 0,05, ****p* < 0,001.

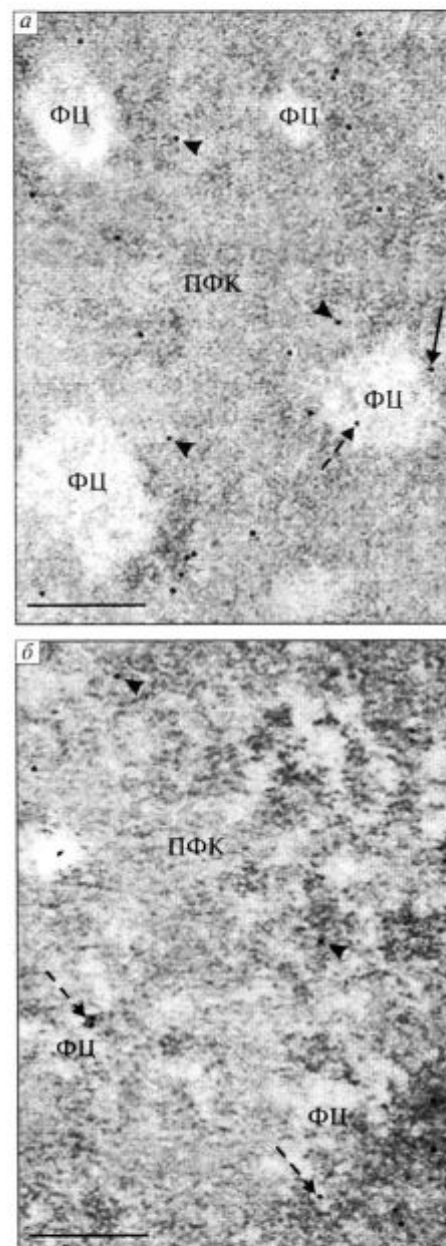


Рис. 4. Иммуноцитохимическая локализация NorA64 в ядрышках меристематических клеток кресс-салата: а — контроль; б — измененная гравитация; ФЦ — фибриллярный центр; ПФК — плотный фибриллярный компонент. Стрелки — мечение переходной зоны ФЦ-ПФК; пунктирные стрелки — мечение фибриллярных центров; головки стрелок — мечение плотного фибриллярного компонента. Масштабный отрезок равен 1 мкм

контролем. Интересно, что снижение было более интенсивным в зонах плотного фибриллярного компонента, не находящегося в контакте с фибриллярными центрами (количество метки

было в 5 раз меньше в условиях измененной гравитации), чем в домене, охватывающем фибриллярные центры и переходную зону ФЦ-ПФК, в котором количество частиц золота было снижено в 2 раза по сравнению с контролем (табл. 3). По-видимому, специфичность локализации метки в переходной зоне ФЦ-ПФК была выше в условиях симулированной микрогравитации, чем в контрольных условиях.

Обсуждение полученных данных. С использованием иммуноблоттинга с моноклональными антителами к фибрилларину мы впервые локализовали фибрилларин из ядрышек меристематических клеток корней кресс-салата с молекулярной массой 41 кДа. Фибрилларин и его гомологи с молекулярными массами 34–38 кДа были идентифицированы в дрожжах, растениях, *Xenopus* и человеке [14, 15, 17, 18, 38]. Следовательно, фибрилларин кресс-салата с молекулярной массой 41 кДа отличается от гомологов, обнаруженных в других типах организмов. Подобно тому, что было показано для меристематических клеток корней лука [15], фибрилларин присутствует в нескольких фракциях ядерных белков из меристематических клеток корней кресс-салата, а именно в растворимой фракции S2, фракции хроматина и нерастворимой фракции ядерного матрикса. Наши данные позволяют предположить, что большая часть фибрилларина присутствует в клетке *in vivo* в растворимой форме. Фракция S2 обогащена рибонуклеопротеинами (РНП), активно вовлеченными в метаболизм ядерной, включая ядрышковую, РНК [39, 40]. Присутствие фибрилларина во фракции хроматина может быть объяснено на основе его наличия в так называемых терминальных шариках (terminal balls) «рождественских елок» («Christmas trees»), которые соответствуют РНП-частицам, содержащим новосинтезированную пре-рРНК (в действительности транскрипция еще продолжается), в которых процессинг начинается в то время, как РНК остается связанной с матрицей рДНК [41, 42]. Эта фракция не обнаружена среди ядерных фракций, полученных в предыдущих исследованиях фибрилларина из клеток лука. Согласно нашей интерпретации пул фибрилларина в нерастворимой форме, ассоциированный с ядерным матриксом, по-видимому, *in vivo* формирует часть неактивных процессом, не связанных с молекулой рДНК.

С использованием одновременной флюоресцентной детекции фибрилларина и ДНК мы показали, что фибриллярные центры окружены зоной, содержащей фибрилларин. Между фибриллярными центрами были выявлены тонкие филаменты деконденсированной рДНК, погруженные в слой фибрилларина, которые соединяли фибриллярные центры друг с другом и с хроматином ядра. Далее с помощью электронной иммуноцитохимии мы обнаружили фибрилларин на периферии фибриллярных центров (т.е. в переходной зоне ФЦ-ПФК) и в плотном фибриллярном компоненте. Было показано, что переходная зона ФЦ-ПФК содержит в 5 раз больше фибрилларина, чем плотный фибриллярный компонент. Высокая концентрация фибрилларина, выявленная нами в переходной зоне ФЦ-ПФК, хорошо согласуется с ранее опубликованными результатами, указывающими, что фибрилларин является компонентом терминальных шариков синтезирующихся молекул пре-рРНК, принимая участие в ранних стадиях процессинга рРНК [41–44]. Однако много других пост-транскрипционных событий в рибосомном биогенезе также зависят от фибрилларина [45].

С использованием электронной иммуноцитохимии мы локализовали NorA64 в фибриллярных центрах, в плотном фибриллярном компоненте и, большей частью, в переходной зоне между фибриллярными центрами и плотным фибриллярным компонентом, которая оказалась в два раза более меченой, чем ПФК. NorA64 является белком, первоначально обнаруженным в клетках лука, который имеет те же иммунологические детерминанты, что и животный нуклеолин, так что мы можем полагать его членом семейства нуклеолина или нуклеолин-подобным белком [31]. NorA64, вероятно, представляет собой редуцированную форму NorA100, который является «настоящим» гомологом нуклеолина в луке [40]. Однако кросс-реакция между антителами к NorA64 и NorA100 и их соответствующими специфическими мишенями как в клетках лука, так и в клетках кресс-салата (неопубликованные данные) позволила нам предположить, что белок, распознаваемый антителами к Nor A64 в клетках кресс-салата *in situ*, является гомологом нуклеолина. Нуклеолин — мультифункциональный белок, который,

как известно, вовлечен в регуляцию процессов конденсации-деконденсации р-хроматина и поддержку рДНК в потенциально активном состоянии [22], в активацию транскрипции рибосомных генов [46], образование процессирующего комплекса пре-рРНК [29, 47] и в дальнейшие стадии процессинга рРНК [48]. На основании распределения фибрилларина, транскрипционного фактора UBF («upstream binding factor») и растительного гомолога нуклеолина NorA64 в ядрышках *Allium cepa*, была разработана модель функциональной архитектуры ядрышка [36]. Согласно этой модели фибриллярные центры являются фокусами аккумуляции рДНК, которая преимущественно транскрибируется в дискретных локусах на периферии фибриллярных центров. Рибосомальная ДНК, протянутая сквозь плотный фибриллярный компонент, соединяет фибриллярные центры между собой и содержит транскрипционно-активные участки. Эта модель хорошо согласуется с результатами, полученными нами для кресс-салата. По нашему мнению, NorA64, выявленный нами в фибриллярных центрах, обеспечивает деконденсированное, потенциально активное состояние рДНК. NorA64, расположенный в переходной зоне ФЦ-ПФК, вероятно, вовлечен в активацию транскрипции рДНК и вместе с фибрилларинном, локализованным вокруг фибриллярных центров, в ранний процессинг синтезирующейся рРНК. Фибрилларин и NorA64, локализованные нами в плотном фибриллярном компоненте, по нашему предположению, участвуют в дальнейших стадиях процессинга рРНК.

В условиях измененной гравитации при использовании электронной иммуноцитохимии мы впервые показали уменьшение количества как фибрилларина, так и NorA64, в переходной зоне ФЦ-ПФК и в самом плотном фибриллярном компоненте. Полученные нами результаты позволили предположить, что в условиях симулированной микрогравитации происходит снижение уровня раннего процессинга рРНК, а также его последующих этапов, что согласуется с ранее опубликованными данными касательно уменьшения относительного объема плотного фибриллярного компонента по сравнению с контролем [49]. Было показано, что уменьшение количества фибрилларина соответствует снижению уровня функционирования ядрышка и, на-

оборот, повышение функциональной активности ядрышка коррелирует с увеличением количества фибрилларина [15, 50, 51]. Эти результаты опровергают концепцию о фибрилларине как простом структурном белке ядрышка растительной клетки, не зависящем от транскрипционной активности р-генов [38]. Сходная тенденция изменений содержания фибрилларина и количества NorA64 в ядрышковых субкомпонентах, выявленная нами в условиях измененной гравитации, позволяет нам предположить, что в ядрышках кресс-салата функции NorA64 преимущественно связаны с процессингом рРНК. Это предположение подтверждается данными о доменной структуре NorA64 в *Allium cepa* и *gar2* в *Schizosaccharomyces pombe* [31, 46, 52].

Изменения структурной организации и функционирования ядрышка, вызванные различными физическими и химическими агентами, широко освещены в литературе [9, 53, 54]. Однако относительно влияния микрогравитации на ядрышко существуют только данные об изменении ядрышкового объема, а именно о его увеличении в условиях клиностагирования [55]. Авторы предположили, что гипертрофия ядрышка может быть следствием изменений ядерно-цитоплазматических отношений в сторону усиления транспорта белков в ядрышко или задержки экспортирования созревающих рибосом из ядрышка в цитоплазму [55]. Основной причиной этих эффектов может быть перепрограммирование генной экспрессии из обычного режима на выполнение стресс-зависимых функций [56]. В космическом полете изменения белкового метаболизма, отмеченные по уменьшению тотального содержания белка на 16 %, были выявлены в клетках *Tetrachymena sp.* и растениях орхидей [57, 58]. Уменьшение содержания белка под действием клиностагирования, свидетельствующее о нарушении биосинтетических процессов, наблюдали в клетках водоросли *Chlorella vulgaris* [59]. Было продемонстрировано увеличение объема конденсированного хроматина в ядре и уменьшение содержания РНК в клетках, что может указывать на снижение уровня транскрипции под влиянием микрогравитации и клиностагирования [60, 61].

Изменения количества и локализации фибрилларина, а также гомолога нуклеолина NorA64, двух важнейших белков процессинга пре-рРНК,

впервые выявленные нами в ядрышковых субкомпонентах в условиях клиностатирования, могут указывать на снижение уровня процессинга рРНК, что позволяет предположить снижение уровня функциональной активности ядрышка под влиянием измененной гравитации. Полученные нами результаты, касающиеся динамики изменений фибрилларина и NopA64 в ядрышковых субкомпонентах, могут быть использованы для биотестирования влияния на растительные клетки как реальной микрогравитации в космических полетных экспериментах, так и других неблагоприятных факторов.

Робота підтримана грантом INTAS №YSF 2001/2-144, грантом Національного космічного агентства України № 2-10/1-00, грантами «Plan Nacional de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico» № ESP2001-4522-PE и ESP2003-09475-C02-02.

SUMMARY. Fibrillarlin and plant nucleolin homologue NopA64 are two important nucleolar proteins involved in pre-rRNA processing. To understand better the effects of the altered gravity environment on the nucleolus functioning we have investigated the location of fibrillarlin and NopA64 in nucleolar subcomponents of cress (*Lepidium sativum* L.) root meristematic cells grown under simulated microgravity that was compared to the control cells grown in normal conditions at 1 g. Cress fibrillarlin was first shown to have the molecular weight 41 kDa. Both fibrillarlin and NopA64 in the cress cell nucleolus are located in the zones known to contain processing pre-rRNA molecules as it has been previously reported in other species. The data confirm participation of these proteins in processomes — RNP complex particles involved in pre-rRNA processing. Under altered gravity a decrease in the quantity of both fibrillarlin and NopA64 in the transition zone between fibrillar centres and the dense fibrillar component was observed, compared to control, which could point out to a lowering of the level of early pre-rRNA processing in these experimental conditions. This decrease was also detected in the bulk of the dense fibrillar component. These data support the idea that altered (reduced) gravity results in lowering the level of functional activity of the nucleolus.

РЕЗЮМЕ. Фібриларин та рослинний гомолог нуклеоліну NopA64 є двома найважливішими ядерцевими білками, які беруть участь в процесингу пре-рРНК. Для розуміння ефектів, які спричинює змінена гравітація на функціонування ядраця, ми дослідили локалізацію фібриларину та NopA64 в ядерцевих субкомпонентах меристематичних клітин коренів проростків крес-салату (*Lepidium sativum* L.), котрі виростили в умовах симульованої мікрогравітації, та порівняли її з контрольною в клітинах, котрі виростили в нормальних умовах, при 1g.

Вперше показано, що фібриларин крес-салату має молекулярну масу 41 кДа. Фібриларин та NopA64 в ядраця клітин крес-салату локалізуються в зонах, які містять процесовані пре-рРНК, як було попередньо показано для інших видів, що підтверджує участь цих білків в рибонуклеопротеїнових комплексних частинках, які задіяні в процесингу пре-рРНК — процесомах. В умовах зміненої гравітації ми вперше показали зменшення кількості як фібриларину, так і NopA64 в перехідній зоні між фібрилярними центрами та щільним фібрилярним компонентом порівняно з контролем, що може вказувати на зниження рівня раннього процесингу пре-рРНК в експериментальних умовах. Подібне зменшення вмісту фібриларину та NopA64 було виявлено і в щільному фібрилярному компоненті, що, ймовірно, свідчить про зниження рівня процесингу пре-рРНК і на наступних етапах. Отримані нами дані дозволяють вперше припустити, що змінена гравітація (клиностатування) викликає зниження рівня функціональної активності ядраця.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Сытник К.М., Кордюм Е.Л., Недуха Е.М., Сидоренко П.Г., Фомичева В.М. Растительная клетка при изменении геофизических факторов. — К.: Наук. думка, 1984. — 136 с.
2. Kordyum E.L. Biology of plant cells in microgravity and under clinostating // *Int. Rev. Cytol.* — 1997. — **171**. — P. 1—78.
3. Claassen D.E., Spooner B.S. Impact of altered gravity on aspects of cell biology // *Int. Rev. Cytol.* — 1994. — **156**. — P. 301—373.
4. Halstead T.W., Dutcher F.R. Plants in space // *Annu. Rev. Plant Physiol.* — 1987. — **38**. — P. 317—345.
5. Moore R., Evans M.L. How roots perceive and respond to gravity // *Amer. J. Bot.* — 1986. — **73**. — P. 574—587.
6. Dedolph R.R., Nagvi S.M., Gordon S.A. The effect of gravity compensation on the geotropic sensitivity of *Avena seedlings* // *Plant Physiol.* — 1965. — **40**. — P. 961—965.
7. Shen-Miller J., Gordon S.A. Gravitational compensation and the phototropic response of oat coleoptiles // *Plant Physiol.* — 1967. — **42**. — P. 352—360.
8. Shen-Miller J., Hinchman R.R. Threshold for the georeponse to acceleration in gravity compensated *Avena seedlings* // *Plant Physiol.* — 1968. — **43**. — P. 338—344.
9. Hadjiolov A.A. The nucleolus and ribosome biogenesis // *Cell Biol. Monogr.* — 1985. — **12**. — P. 1—268.
10. Medina F.J., Cerdido A., De Carcer G. The functional organization of the nucleolus in proliferating plant cells // *Eur. J. Histochem.* — 2000. — **44**. — P. 117—131.
11. Scheer U., Hock R. Structure and function of the nucleolus // *Curr. Opin. in Cell Biol.* — 1999. — **11**. — P. 385—390.
12. Hernandez-Verdun D. The nucleolus today // *J. Cell Sci.* — 1991. — **99**. — P. 465—471.
13. Medina F.J., Cerdido A., Fernandez-Gomez M.E. Components of the nucleolar processing complex (pre-rRNA, fibrillarlin, and nucleolin) colocalize during mitosis and are incorporated to daughter cell nucleoli // *Exp. Cell Res.* — 1995. — **221**. — P. 111—125.

14. *Aris J.P., Blobel G.* cDNA cloning and sequencing of human fibrillarin, a conserved nucleolar protein recognized by autoimmune antisera // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1991. — **88.** — P. 931–935.
15. *Cerdido A., Medina F.J.* Subnucleolar location of fibrillarin and variation in its levels during the cell cycle and during differentiation of plant cells // *Chromosoma.* — 1995. — **103.** — P. 625–634.
16. *Girard J.-P., Lehtonen H., Caizergues-Ferrer M., Amalric F., Tollervey D., Lapeyre B.* GAR1 is an essential small nucleolar RNP protein required for pre-rRNA processing in yeast // *EMBO J.* — 1992. — **11.** — P. 673–682.
17. *Lapeyre B., Mariottini P., Mathieu C., Ferrer P., Amaldi F., Amalric F., Caizergues-Ferrer M.* Molecular cloning of *Xenopus* fibrillarin, a conserved U3 small nuclear ribonucleoprotein recognized by antisera from humans with autoimmune disease // *Mol. Cell Biol.* — 1990. — **10.** — P. 430–434.
18. *Schimmang T., Tollervey D., Kern H., Frank R., Hurt E.C.* A yeast nucleolar protein related to mammalian fibrillarin is associated with small nucleolar RNA and is essential for viability // *EMBO J.* — 1989. — **8.** — P. 4015–4024.
19. *Testillano P.S., Gorab E., Risueno M.C.* A new approach to map transcription sites at the ultrastructural level // *J. Histochem. Cytochem.* — 1994. — **42.** — P. 1–10.
20. *Ginisty H., Sicard H., Roger B., Bouvet P.* Structure and functions of nucleolin // *J. Cell Sci.* — 1999. — **112.** — P. 761–772.
21. *Crocker J.* Nucleolar organizer regions // *Curr. Top. Pathol.* — 1990. — **82.** — P. 91–149.
22. *Erard M.S., Lakhdar-Ghazal F., Amalric F.* Repeat peptide motifs which contain beta-turns and modulate DNA condensation in chromatin // *Eur. J. Biochem.* — 1990. — **191.** — P. 19–26.
23. *Murakami T., Ohmori H., Gotoh S., Tsuda T., Ohya R., Akiya S., Higashi K.* Down modulation of N-myc, heat-shock protein 70 and nucleolin during the differentiation of human neuroblastoma cells // *J. Biochem.* — 1991. — **110.** — P. 146–150.
24. *Bouvet P., Jain C., Belasco J.G., Amalric F., Erard M.* RNA recognition by the joint action of two nucleolin RNA-binding domains: genetic analysis and structural modeling // *EMBO J.* — 1997. — **16.** — P. 5235–5246.
25. *Burd C.G., Dreyfuss G.* Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins // *Science.* — 1994. — **265.** — P. 615–621.
26. *Ginisty H., Amalric F., Bouvet P.* Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing // *EMBO J.* — 1998. — **17.** — P. 1476–1486.
27. *Nagai K.* RNA-protein complexes // *Curr. Opin. Struct. Biol.* — 1996. — **6.** — P. 53–61.
28. *Serin G., Joseph G., Ghisolfi L., Bauzan M., Erard M., Amalric F., Bouvet P.* Two RNA-binding domains determine the RNA-binding specificity of nucleolin // *J. Biol. Chem.* — 1997. — **272.** — P. 13109–13116.
29. *Ghisolfi-Nieto L., Joseph G., Puvion-Dutilleul F., Amalric F., Bouvet P.* Nucleolin is a sequence-specific RNA-binding protein: characterization of targets on pre-ribosomal RNA // *J. Mol. Biol.* — 1996. — **260.** — P. 34–53.
30. *Heine M.A., Rankin M.L., DiMario P.J.* The Gly/Arg-rich (GAR) domain of *Xenopus* nucleolin facilitates *in vitro* nucleolar acid binding and *in vivo* nucleolar localization // *Mol. Biol. Cell.* — 1993. — **4.** — P. 1189–1204.
31. *De Carcer G., Cerdido A., Medina F.J.* NopA64, a novel nucleolar phosphoprotein from proliferating onion cells, sharing immunological determinants with mammalian nucleolin // *Planta.* — 1997. — **201.** — P. 487–495.
32. *Hilaire E., Guikema J.A., Brown C.S.* Clinorotation affects soybean seedling morphology // *J. Gravit. Physiol.* — 1995. — **2.** — P. 149–150.
33. *Kessler J.O.* The internal dynamics of slowly rotating biological systems // *ASGSB Bull.* — 1992. — **5.** — P. 11–22.
34. *Kordyum E.L.* Effects of altered gravity on plant cell processes: Results of recent space and clinostatic experiments // *Adv. Space Res.* — 1994. — **14.** № 8. — P. 77–85.
35. *Reimer G., Pollard K.M., Penning C.A., Ochs R.L., Lischwe M.A., Busch H., Tan E.M.* Monoclonal autoantibody from a (New Zealand black × New Zealand white) F1 mouse and some human scleroderma sera target an Mr 34,000 nucleolar protein of the U3 RNP particle // *Arthrit. and Rheumat.* — 1987. — **30.** № 7. — P. 793–800.
36. *De Carcer G., Medina F.J.* Simultaneous localization of transcription and early processing markers allows dissection of functional domains in the plant cell nucleolus // *J. Struct. Biol.* — 1999. — **128.** — P. 139–151.
37. *Соболь М.А.* Влияние измененной гравитации на количество и локализацию фибрилларина в ядрышках корневой меристемы кресс-салата // *Цитология и генетика.* — 2003. — **37.** № 4. — С. 40–45.
38. *Testillano P.S., Sanchez-Pina M.A., Lopez-Iglesias C., Olmedilla A., Christensen M.E., Risueno M.C.* Distribution of B-36 nucleolar protein in relation to transcriptional activity in plant cells // *Chromosoma.* — 1992. — **102.** — P. 41–49.
39. *Bourbon H., Bugler B., Caizergues-Ferrer M., Amalric F.* Role of phosphorylation on the maturation pathways of a 100 kDa nucleolar protein // *FEBS Lett.* — 1983. — **155.** — P. 218–222.
40. *Gonzalez-Camacho F., Medina F.J.* Identification of specific plant nucleolar phosphoproteins in a functional proteomic analysis // *Proteomics.* — 2004. — **4.** — P. 407–417.
41. *Mougey E.B., O'Reilly M., Osheim Y., Miller O.L., Beyer A., Sollner-Webb B.* The terminal balls characteristic of eukaryotic rRNA transcription units in chromatin spreads are rRNA processing complexes // *Genes Dev.* — 1993. — **7.** — P. 1609–1619.
42. *Scheer U., Benavente R.* Functional and dynamic aspects of the mammalian nucleolus // *Bio. Essays.* — 1990. — **12.** — P. 14–21.
43. *Kass S., Tyc K., Steitz J.A., Sollner-Webb B.* The U3 small nucleolar ribonucleoprotein functions in the first step of preribosomal RNA processing // *Cell.* — 1990. — **60.** — P. 897–908.
44. *Tollervey D., Lehtonen H., Carmo-Fonseca M., Hurt E.C.* The small nucleolar RNP protein NOP1 (fibrillarin) is required for pre-rRNA processing in yeast // *EMBO J.* — 1991. — **10.** — P. 573–583.

45. Tollervey D., Lehtonen H., Jansen R., Kern H., Hurt E.C. Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly // *Cell*. — 1993. — 72. — P. 443–457.
46. Caizergues-Ferrer M., Belenguer P., Lapeyre B., Amalric F., Wallace M.O., Olson M.O. Phosphorylation of nucleolin by a nucleolar type NII protein kinase // *Biochemistry*. — 1987. — 26. — P. 7876–7883.
47. Lazdins I.B., Delannoy M., Sollner-Webb B. Analysis of nucleolar transcription and processing domains and pre-rRNA movements by in situ hybridization // *Chromosoma*. — 1997. — 105. — P. 481–495.
48. Tong C.G., Reichler S., Blumenthal S., Balk J., Hsieh H.L., Roux S.J. Light regulation of the abundance of mRNA encoding a nucleolin-like protein localized in the nucleoli of pea nuclei // *Plant Physiol.* — 1997. — 114. — P. 643–652.
49. Соболев М.А. Вплив кліностатування та мікрогравітації на ультраструктуру та функції ядерець рослинних клітин // *Косм. наука і технологія*. — 2001. — 7, № 1. — С. 183–186.
50. Haaf T., Steinlein C., Schmid M. Nucleolar transcriptional activity in mouse Sertoli cells is dependent on centromere arrangement // *Exp. Cell Res.* — 1990. — 191. — P. 157–160.
51. Ochs R.L., Smetana K. Detection of fibrillarin in nucleolar remnants and the nucleolar matrix // *Exp. Cell Res.* — 1991. — 197. — P. 183–190.
52. Gulli M.P., Girard J.P., Zabetakis D., Lapeyre B., Melese T., Caizergues-Ferrer M. Gar2 is a nucleolar protein from *Schizosaccharomyces pombe* required for 18S rRNA and 40S ribosomal subunit accumulation // *Nucl. Acids Res.* — 1995. — 23. — P. 1912–1918.
53. Соболев М.А. Роль ядрышка в реакциях растительных клеток на действие физических факторов окружающей среды // *Цитология и генетика*. — 2001. — 35, № 3. — С. 72–84.
54. Risueno M.C., Medina F.J. The nucleolar structure in plant cells // *Cell Biol. Rev.* — 1986. — 7. — P. 1–154.
55. Shen-Miller J., Hinchman R.R. Nucleolar transformation in plants grown on clinostats // *Protoplasma*. — 1995. — 185. — P. 194–204.
56. Scharf K.-D., Nover I. Synthesis and degradation of ribosomes // *Heat shock response*. — Boca Raton: CRC Press, 1991. — P. 282–298.
57. Таирбеков М.Г., Ирлина И.С., Райков И.Б. Одноклеточные организмы в условиях микрогравитации (эксперимент «Цитос») // *Результаты исследований на биоспутниках*. — М.: Наука, 1992. — С. 299–306.
58. Червченко Т.М., Майко Т.И., Богатырь В.Б., Косаківська И.В. Перспективы использования тропических орхидей для космических исследований // *Космическая биология и биотехнология*. — Киев: Наук. думка, 1986. — С. 41–54.
59. Попова А.Ф., Мушак П.О. Ультраструктура хлоропластов та вміст білка в клітинах *Chlorella vulgaris* при кліностатуванні // *Доп. НАН України*. — 1998. — № 5. — С. 179–182.
60. Попова А.Ф., Кордюм Е.Л., Сытник К.М. Субмикроскопическая организация клеток хлореллы в поликомпонентной системе в условиях космического полета // *Докл. АН УССР. Сер. Б.* — 1989. — № 8. — С. 74–78.
61. Сытник К.М., Мусатенко Л.И. Изменение нуклеиновых кислот проростков пшеницы в условиях космического полета // *Докл. АН УССР. Сер. Б.* — 1980. — № 2. — С. 77–80.

Поступила 09.09.04