

М.А. СОБОЛЬ<sup>1</sup>, Е.Л. КОРДЮМ<sup>1</sup>,  
Ф.Х. МЕДИНА<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, Киев  
E-mail: margaret\_sobol@yahoo.com; cell@svitonline.com

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

## ИЗМЕНЕНИЯ ЛОКАЛИЗАЦИИ ВНУТРИЯДРЫШКОВОЙ ДНК, ВЫЗВАННЫЕ СИМУЛИРОВАННОЙ МИКРОГРАВИТАЦИЕЙ



*Функционирование ядрышка, отвечающего за биосинтез рибосом, в условиях измененной гравитации остается все еще неясным. Была исследована локализация ядрышковой ДНК в контроле и в условиях симулированной микрогравитации с помощью методов флуоресцентной и электронной иммуноцитохимии. Мы впервые выявили перераспределение рибосомальной ДНК в ядрышковых компонентах, сопровождающееся изменениями их ультраструктуры. На основе полученных нами результатов предполагается снижение уровня транскрипции рибосомальной ДНК в условиях симулированной микрогравитации.*

© М.А. СОБОЛЬ, Е.Л. КОРДЮМ, Ф.Х. МЕДИНА, 2006

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2006. № 1

**Введение.** Как известно, микрогравитация влияет на метаболизм клетки, что отражается в перестройках ультраструктуры и функциональной нагрузки клеточных органелл [1]. В литературе приведены данные относительно структурно-функциональной организации митохондрий, хлоропластов, аппарата Гольджи, эндоплазматического ретикулума в условиях клиностатирования и реальной микрогравитации [1–4], однако лишь незначительное количество работ посвящено влиянию измененной гравитации на ядрышко, причем приведены результаты, касающиеся только изменений его структуры [5–7].

Ядрышко является сайтом транскрипции рибосомальной ДНК (рДНК), а также сборки и процессинга рибосом [8]. До сих пор структура ядрышка как показатель его функциональной активности остается предметом для дискуссий. Тремя основными ядрышковыми субкомпонентами являются фибриллярные центры (ФЦ), плотный фибриллярный компонент (ПФК) и гранулярный компонент (ГК) [9, 10]. ФЦ являются резервуарами транскрипционных комплексов, состоящих из рДНК, потенциально-активной, но не транскрибируемой в настоящее время, и участвующих в транскрипции белков [11]. ПФК состоит из транскрипционно-активных локусов рДНК и транскриптов пре-рРНК на различных этапах процессинга [12], в то время как поздний процессинг рРНК и формирование рибосомных субъединиц происходят в ГК [13]. Определение точной локализации рДНК в ядрышке является существенным для понимания его функционирования в условиях измененной гравитации. Целью наших исследований было выявление локализации внутриядрышковой ДНК в условиях симулированной микрогравитации.

**Материалы и методы.** Были исследованы клетки апикальной меристемы корней проростков кресс-салата (*Lepidium sativum* L.). Меристемы корней были отделены от проростков, выросших в 1%-ной агаровой среде на медленном горизонтальном клиностате (2 об/мин) и в стационарных условиях в темноте в течение двух дней. Клетки кресс-салата фиксировали в 4%-ном формальдегиде с добавлением 0,5%-ного глютаральдегида на фосфатном буфере в течение 2 ч, дегидратировали в этаноле повышающейся концентрации и заключали в акри-

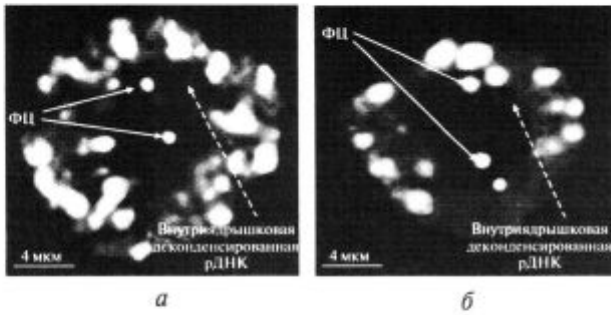


Рис. 1. Трехмерная реконструкция ядрышковой ДНК, полученная с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа: *а* — контроль, *б* — симулированная микрогравитация

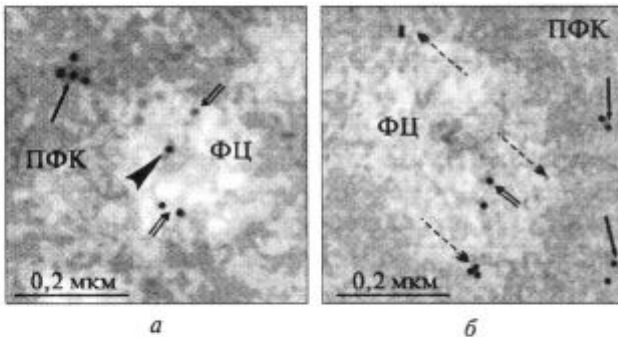


Рис. 2. Локализация ДНК в ядрышке с использованием мечения антителами к ДНК (*а*), а также TdT метода (*б*) (электронная иммуноцитохимия) в контроле: головки стрелок — меченый р-хроматин внутри гетерогенных ФЦ, двойные стрелки — меченые фибриллы деконденсированной рДНК во внутреннем пространстве ФЦ, пунктирные стрелки — меченая переходная зона ФЦ-ПФК, стрелки — меченый ПФК

ловую смолу LRWhite или смолу Immuno-Bed в зависимости от последующих процедур. Тонкие срезы Immuno-Bed толщиной 4 мкм монтировали на предметных стеклах, покрытых аптесом, инкубировали в 4',6-диамидин-2-фенилиндоле (DAPI) и заключали в Mowiol, уменьшающий потерю флуоресценции. Ультратонкие срезы LRWhite толщиной 70–80 нм монтировали на покрытых формваром никелевых сетках, инкубировали с моноклональными антителами к ДНК («Progen», Германия), разведенными в соотношении 1 : 5, и со вторичными антителами (козья сыворотка против иммуноглобулинов IgM мыши, конъюгированная с частицами золота диаметром 10 нм) в разведении 1 : 20. Одновременно ультратонкие

срезы LRWhite обрабатывали 5-бромо-2-деоксиуридин (BUdR) трифосфатом и терминальной деоксинуклеотидилтрансферазой (TdT), инкубировали с антителами к BUdR, разведенными в соотношении 1 : 20, и со вторичными антителами (козья сыворотка против иммуноглобулинов IgM мыши, конъюгированная с частицами золота диаметром 10 нм) в разведении 1 : 40. В конце обоих иммуноцитохимических процессов ультратонкие срезы окрашивали 2%-ным водным раствором уранилацетата. Контроль мечения проводили, опуская инкубацию с первичными антителами. Микроскопирование препаратов, инкубированных в DAPI, осуществляли с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Leica TCS SP2-DM IRE2 при длине волны возбуждения 358 нм и длине волны эмиссии 461 нм; иммерсионный объектив  $\times 63$ . Ультраструктурные иммуноцитохимические препараты исследовали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа Philips EM300 при 80 кВ. Плотность мечения субъядрышковых компонентов рассчитывали, используя программу «QWin Standard» (Leica, Германия) для автоматического анализа изображений.

**Результаты исследований.** В контроле с использованием инкубации в DAPI и конфокальной лазерной микроскопии детекция ДНК на каждой сканируемой оптической поверхности выявила ядрышко как темную зону, окруженную слоем диффузного хроматина ядра. Кластеры конденсированного хроматина были визуализированы как яркие пятна на фоне умеренно флуоресцирующего диффузного хроматина. Внутри ядрышка выявлялись яркие маленькие участки правильной округлой формы. По нашему мнению, эти участки представляют собой фибриллярные центры, содержащие внутри конденсированную рДНК, так называемые гетерогенные ФЦ (рис. 1, *а*).

Между фибриллярными центрами была выявлена тонкая сетка ДНК-филаментов, связывающая ФЦ между собой и с хроматином ядра (рис. 1, *а*). Мы предполагаем, что она представляет собой тяжи деконденсированной рДНК, задействованной в транскрипции.

Мечение антителами к ДНК и мечение по TdT методу на ультраструктурном уровне выя-

вило ДНК ядра, пластид и митохондрий. В ядре наиболее мечеными оказались блоки гетерохроматина. Значительно меньшее количество частиц золота было выявлено в районе локализации диффузного хроматина. В ядрышке метка была локализована в ФЦ и ПФК. В фибриллярных центрах частицы золота были выявлены над кластерами конденсированного хроматина, внутренними фибриллами деконденсированной рДНК и в переходной зоне ФЦ-ПФК, которая в настоящее время рассматривается как область, где происходит транскрипция рДНК и ранний процессинг рРНК [9, 11] (рис. 2, а, б).

Иногда частицы золота были расположены в линию, простиравшуюся от ФЦ в ПФК. Гранулярный компонент и ядрышковые вакуоли были лишены метки.

По количественному распределению метки в ядрышке, гомогенные и гетерогенные фибриллярные центры оказались более плотно мечеными, чем плотный фибриллярный компонент (рис. 3, а, б).

В условиях симулированной микрогравитации детекция ДНК на каждой сканированной оптической поверхности не выявила особых отличий во внешнем виде ядрышка, состоянии диффузного хроматина и расположении кластеров конденсированного хроматина ядра по сравнению с контролем. Гетерогенные фибриллярные центры так же, как и в контроле, были локализованы в ядрышке в виде ярких маленьких зон. Как и в стационарных условиях, филаменты транскрибируемой рДНК связывали фибриллярные центры между собой и с хроматином ядра (рис. 1, б). Мы обнаружили, что условия симулированной микрогравитации вызывали увеличение в полтора раза как общего количества гетерогенных фибриллярных центров, так и среднего количества гетерогенных ФЦ на ядрышко по сравнению с контролем (рис. 1, б, таблица).

В условиях клиностаტიрования метка антител к ДНК и метка TdT на ультраструктурном уровне выявили ядерную, пластидную и митохондриальную ДНК. В ядре блоки гетерохроматина были мечены больше, чем в контроле. Над диффузным хроматином было выявлено умеренное количество частиц золота. Мы обнаружили, что в ядрышке метка антител к

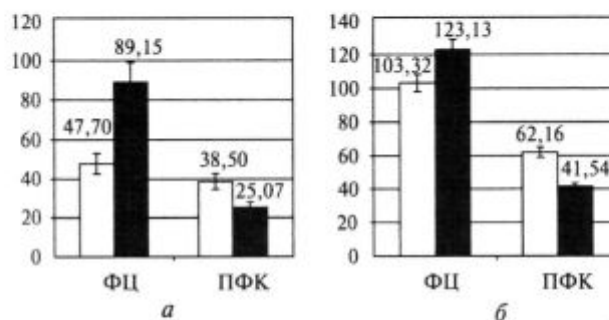


Рис. 3. Гистограмма распределения метки антител к ДНК (а) и по TdT методу (б) в ядрышковых субкомпонентах в контроле и в условиях симулированной микрогравитации: по вертикали — количество гранул золота в 1 мкм<sup>2</sup>; □ — контроль; ■ — симулированная микрогравитация

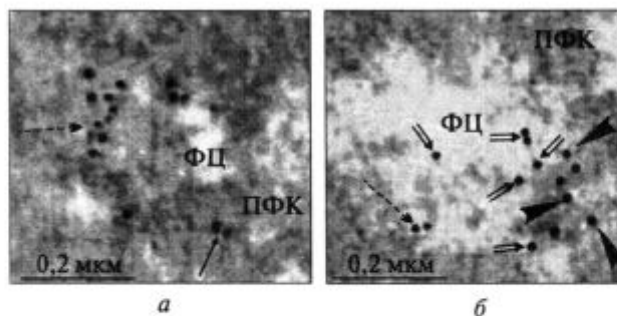


Рис. 4. Локализация ДНК в ядрышке с использованием метки антителами к ДНК (а), а также TdT метода (б) (электронная иммуноцитохимия) в условиях симулированной микрогравитации. Обозначения те же, что и на рис. 2

Количество гетерогенных фибриллярных центров в ядрышках в контроле и в условиях симулированной микрогравитации

Параметр	Контроль	Симулированная микрогравитация
Количество ядрышек с гетерогенными ФЦ	63	56
Общее количество гетерогенных ФЦ	157	215
Среднее количество гетерогенных ФЦ на ядрышко	2,49 ± 0,26	3,84 ± 0,38**

Примечание. Среднее ± стандартное отклонение, \*\*p < 0,01. n = 100, где n — общее количество ядрышек.

ДНК, как и метка TdT, были перераспределены между ФЦ и ПФК по сравнению с контролем (рис. 4, а, б).

В полтора раза большее количество частиц золота было локализовано над фибриллярными центрами. Плотный фибриллярный компонент был мечен в полтора раза меньше, чем в контроле (рис. 3, а, б). В фибриллярных центрах в отличие от контроля более мечеными оказались блоки конденсированного р-хроматина и внутренняя рДНК, а переходная зона ФЦ-ПФК содержала меньшее количество метки (рис. 4, а, б).

**Обсуждение полученных данных.** При использовании флюоресцентной детекции ДНК мы выявили фибриллярные центры, содержащие внутри конденсированную рДНК, так называемые гетерогенные фибриллярные центры. С помощью электронной иммуноцитохимии нами было продемонстрировано, что в фибриллярных центрах локализованы кластеры конденсированного хроматина, внутренние фибриллы деконденсированной рДНК, а также переходная зона ФЦ-ПФК. Кластеры конденсированного хроматина в фибриллярных центрах образованы сегментами рДНК, временно выведенными из состояния активации, и/или межгенными нетранскрибируемыми спейсерными районами рДНК [9, 11, 14–16]. Между фибриллярными центрами выявлена тонкая сетка ДНК-филаментов, связывающая фибриллярные центры между собой и с хроматином ядра. Эти филаменты ДНК образуют плотный фибриллярный компонент, меченый на ультраструктурном уровне антителами к ДНК и по TdT методу. Полученные нами результаты совпадают с литературными данными о наличии в фибриллярных центрах большего количества рДНК в сравнении с плотным фибриллярным компонентом [18–22].

Мы впервые продемонстрировали, что в условиях клиностагирования происходит изменение локализации рДНК из плотного фибриллярного компонента и переходной зоны ФЦ-ПФК в фибриллярные центры, сопровождаемое увеличением общего количества гетерогенных фибриллярных центров и среднего количества гетерогенных фибриллярных центров на ядрышко, что указывает на переход рДНК в потенциально-активное состоя-

ние и конденсацию определенной ее части до гетерохроматиновых блоков. Это дает возможность предположить уменьшение количества задействованных в транскрипции р-генов, а также потенциально-активных кластеров рДНК, что позволяет нам впервые высказать предположение о снижении уровня транскрипции рДНК под влиянием симулированной микрогравитации. Известно, что в ядрышке с повышенной активностью гетерохроматин фибриллярных центров постепенно деконденсируется с образованием тонких фибрилл рДНК. Напротив, при снижении уровня функциональной активности ядрышка рДНК внутри фибриллярных центров постепенно конденсируется до образования кластеров гетерохроматина [17, 18]. Постулируется, что конформационные изменения фибриллярных центров тесно связаны с транскрипционной активностью рДНК [16]. Появление больших фибриллярных центров, которые содержали внутри блоки конденсированного хроматина, было продемонстрировано при влиянии пониженной температуры на *Zea mays* и *Pisum sativum* [23]. Было высказано предположение [23], что в ходе инактивации транскрипции р-генов, вызванной действием холодного стресса, транскрибируемая рДНК переходит из плотного фибриллярного компонента в фибриллярные центры с последующей конденсацией и образованием блоков гетеро-р-хроматина. Постепенная концентрация внутриядрышковой рДНК в фибриллярных центрах с образованием одного или нескольких кластеров гетерохроматина описана также при действии гипоксии на *Allium cepa* и *Vicia faba* [24, 25]. Известно, что влияние гипоксии уменьшает пул УТР и, возможно, исчерпывает доступный для клеток пул АТР, тем самым снижая транскрипционную активность рДНК [26, 27]. По мнению японских ученых [24], в условиях гипоксии именно снижение уровня транскрипции р-генов приводит к переходу рДНК, задействованной в транскрипции, из плотного фибриллярного компонента в фибриллярные центры.

Перераспределение рДНК в ядрышковых субкомпонентах, сопровождаемое увеличением количества гетерогенных фибриллярных центров в ядрышке и впервые выявленное нами в условиях клиностагирования, указывает,

по нашему мнению, на снижение уровня транскрипции рДНК, что позволяет нам впервые высказать предположение о снижении уровня функциональной активности ядрышка под влиянием симулированной микрогравитации.

*Работа поддержана грантом INTAS № YSF 2001/2-144, грантом Национального космического агентства Украины № 2-10/1-00, грантами «Plan Nacional de Investigacion Cientifica y Desarrollo Tecnológico» № ESP2001-4522-PE и ESP2003-09475-C02-02. Мы выражаем благодарность д-ру Ф. Гонсалесу-Камачо, д-ру В. Родригес-Вилариньо, д-ру Д. Лопесу-Гонсалесу за методологическую помощь и д-ру М. Карноте за техническую помощь.*

**SUMMARY.** The functions of the nucleolus responsible for the biosynthesis of ribosomes in altered gravity are still unclear. The location of nucleolar DNA both in control and simulated microgravity has been investigated using fluorescent and immunogold cytochemistry. We have determined the redistribution of rDNA in the nucleolar components accompanied by their ultrastructure changes. According to this the lowering of rDNA transcription level under simulated microgravity was supposed.

**РЕЗЮМЕ.** Функціонування ядерця, яке відповідає за біосинтез рибосом, в умовах зміненої гравітації залишається все ще нез'ясованим. Була досліджена локалізація ядерцевої ДНК в контролі та в умовах симульованої мікрогравітації за допомогою методів флуоресцентної та електронної імуноцитохімії. Ми вперше виявили перерозподіл рибосомальної ДНК в ядерцевих компонентах, який супроводжується змінами їх ультраструктури. На основі отриманих нами результатів припускається зниження рівня транскрипції рибосомальної ДНК в умовах симульованої мікрогравітації.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kordyum E.L.* Biology of plant cells in microgravity and under clinostating // *Int. Rev. Cytol.* — 1997. — **171**. — P. 1—78.
2. *Claassen D.E., Spooner B.S.* Impact of altered gravity on aspects of cell biology // *Int. Rev. Cytol.* — 1994. — **156**. — P. 301—373.
3. *Halstead T.W., Dutcher F.R.* Plants in space // *Annu. Rev. Plant Physiol.* — 1987. — **38**. — P. 317—345.
4. *Moore R., Evans M.L.* How roots perceive and respond to gravity // *Amer. J. Bot.* — 1986. — **73**. — P. 574—587.
5. *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.
6. *Shen-Miller J., Gordon S.A.* Gravitational compensation and the phototropic response of oat coleoptiles // *Plant Physiol.* — 1967. — **42**. — P. 352—360.
7. *Shen-Miller J., Hinchman R.R.* Threshold for the georeponse to acceleration in gravity compensated *Avena* seedlings // *Plant Physiol.* — 1968. — **43**. — P. 338—344.
8. *Scheer U., Hock R.* Structure and function of the nucleolus // *Cur. Opinion in Cell Biol.* — 1999. — **11**. — P. 385—390.
9. *Yano H., Sato S.* Combination of electron microscopic in situ hybridization and anti-DNA antibody labelling reveals a peculiar arrangement of ribosomal DNA in the fibrillar centres of the plant cell nucleolus // *J. Electron Microsc.* — 2002. — **51**, № 4. — P. 231—239.
10. *Соболь М.А.* Роль ядрышка в реакциях растительных клеток на действие физических факторов окружающей среды // *Цитология и генетика.* — 2001. — **35**, № 3. — С. 72—84.
11. *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.
12. *Dundr M., Raska I.* Nonisotopic ultrastructural mapping of transcription sites within the nucleolus // *Exp. Cell Res.* — 1993. — **208**. — P. 275—281.
13. *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.
14. *Risueno M.C., Medina F.J.* The nucleolar structure in plant cells // *Cell Biol. Rev.* — 1986. — **7**. — P. 1—154.
15. *Yano H., Sato S.* Cytochemical localization of intranucleolar DNA and RNA in *Allium cepa* root-tip cells // *J. Electron. Microsc.* — 1995. — **44**. — P. 337—343.
16. *Yano H., Sato S.* Ultrastructural localization of transcription sites, DNA, and RNA reveals a concentric arrangement of structural and functional domains in plant nucleolonema // *Protoplasma.* — 2000. — **214**. — P. 129—140.
17. *Highett M.I., Rawlins D.J., Shaw P.J.* Different patterns of rDNA distribution in *Pisum sativum* nucleoli correlate with different levels of nucleolar activity // *J. Cell Sci.* — 1993. — **104**. — P. 843—852.
18. *Motte P., Loppes R., Menager M., Deltour R.* Three-dimensional electron microscopy of ribosomal chromatin in two higher plants: A cytochemical, immunocytochemical, and in situ hybridization approach // *J. Histochem. Cytochem.* — 1991. — **39**. — P. 1495—1506.
19. *Martin M., Moreno Diaz De La Espina S., Medina F.J.* Immunolocalization of DNA at nucleolar structural

- components in onion cells // *Chromosoma*. — 1989. — **98**. — P. 368—377.
20. Rawlins D.J., Shaw P.J. Three-dimensional organization of ribosomal DNA in interphase nuclei of *Pisum sativum* by in situ hybridization and optical tomography // *Chromosoma*. — 1990. — **99**. — P. 143—151.
21. Scheer U., Raska I. Immunocytochemical localization of RNA polymerase I in the fibrillar centers of nucleoli // *Chromosomes Today*. — 1987. — **9**. — P. 284—294.
22. Thiry M., Thiry-Blaise L. In situ hybridization at the electron microscope level : An improved method for precise localization of ribosomal DNA and RNA // *Eur. J. Cell Biol.* — 1989. — **50**. — P. 235—243.
23. Mineur P., Jennane A., Thiry M., Deltour R., Goessens G. Ultrastructural distribution of DNA within plant meristematic cell nucleoli during activation and the subsequent inactivation by a cold stress // *J. Struct. Biol.* — 1998. — **123**. — P. 199—210.
24. Yamada M., Sato S. Effect of hypoxia on nucleoli in excised root tips of *Vicia faba*: immunoelectron microscopy using anti-DNA antibodies // *Cytologia*. — 1996. — **61**. — P. 403—410.
25. Yano H., Sato S. Alterations of the intranucleolar DNA localization caused by hypoxic conditions in excised root tips of *Allium cepa* // *J. Electron Microsc.* — 1999. — **48**, № 6. — P. 947—955.
26. Aspart L., Got A., Delseny M., Mogot B., Pradet A. Adaptation of ribonucleic acid metabolism to anoxia in rice embryos // *Plant Physiol.* — 1983. — **72**. — P. 115—121.
27. Fernandez-Gomez M.E., Moreno Diaz De La Espina S., Risueno M.C. Nucleolar activity in anoxic root meristem cells of *Allium cepa* // *Env. Exp. Bot.* — 1984. — **24**. — P. 219—228.

Поступила 11.07.05