

## ИНДУКЦИЯ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОЙ СБОРКИ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ЯДРЫШКА В МЕТАФАЗНЫХ КЛЕТКАХ CV1 И HeLa С ПОМОЩЬЮ ОБРАТИМОГО ГИПОТОНИЧЕСКОГО ШОКА

© О. О. Жарская, О. В. Зацепина<sup>1</sup>

*Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета  
и Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва;*

<sup>1</sup> электронный адрес: [zatsepina\\_olga@mail.ru](mailto:zatsepina_olga@mail.ru)

Формирование в телофазных клетках телец, получивших название цитоплазматических производных (дериватов) ядрышка, или ЦЯД, является одной из ранних стадий сборки ядрышка в митозе. В современной литературе уделяется большое внимание молекулярному составу и участию ЦЯД в восстановлении активного ядрышка, однако практически ничего не известно о механизмах, контролирующих их образование. Впервые показано, что обратимое воздействие растворов низкой ионной силы (гипотонического шока) на митотические клетки человека HeLa и зеленой мартышки CV1 индуцирует преждевременное образование ЦЯД на стадии метафазы. Подобно естественным (телофазным) ЦЯД, «метафазные» дериваты ядрышка содержат РНК, а также белки, необходимые для процессинга рРНК (фибриллин, В23/нуклеофозмин и С23/нуклеолин), но не содержат фактора транскрипции рибосомных генов — белка UBF. Высказано предположение о том, что обратимое воздействие гипотонической среды на метафазные клетки вызывает временное повышение концентрации свободного  $Ca^{2+}$  в цитоплазме, что инициирует процесс преждевременного завершения митоза после переноса клеток в изотонические условия. Важную роль в реакции клеток на гипотоническое воздействие и в сборке ЦЯД играет структурная целостность митотического аппарата.

Ключевые слова: ядрышко, митоз, цитоплазматические ядрышковые дериваты, механизмы формирования.

Принятые сокращения: DAPI — 4',6-диамидино-2-фенилиндол, мЯРНК — малые ядрышковые РНК, рРНК — 45—47S рРНК, cdk1 — циклинзависимая киназа p34<sup>cdc2</sup>, ЦЯД — цитоплазматические производные (дериваты) ядрышка, ЯОР — ядрышкообразующие районы хромосом.

Основные функции ядрышка — транскрипция рибосомных генов (рДНК), процессинг 45—47S транскриптов пре-рРНК и сборка рибосомных частиц — осуществляются главным образом на стадии интерфазы, когда ядрышко сохраняет структурную и функциональную целостность (Olson et al., 2002). При вступлении клеток в митоз транскрипция рДНК постепенно прекращается, а значительная часть ядрышковых белков и РНК мигрируют в цитоплазму и (или) ассоциируют с поверхностью хромосом (Dimario, 2004; Leung et al., 2004). Эти изменения сопровождаются фосфорилированием ядрышковых белков, таких как факторы транскрипции рДНК UBF и S11 (Heix et al., 1997) и основные фосфопротеины ядрышка, участвующие в созревании транскриптов рРНК, белки В23/нуклеофозмин и С23/нуклеолин. Гиперфосфорилирование этих белков осуществляется с помощью основной митотической киназы p34<sup>cdc2</sup> (Peter et al., 1990), активность которой регулируется циклином В и которая в современной литературе получила название «циклинзависимая киназа cdk1» (Епифанова, 2003). Показано, что повышение уровня фосфорилирования белка В23 негативно регулирует его способность взаимодействовать с рРНК и способствует миграции В23 из ядрышка в цито-

плазму в метафазе (Okuwaki et al., 2002). В гиперфосфорилированном состоянии белки сохраняются до конца митоза, когда активность cdk1 падает.

Восстановление ядрышка начинается в поздней анафазе или ранней телофазе с реактивации транскрипции рДНК. Важную роль в этом процессе играет дефосфорилирование UBF и S11, так что избирательное ингибирование p34<sup>cdc2</sup> в метафазных клетках приводит к преждевременной активации транскрипции рДНК (Sirri et al., 2000). При нормальном митозе реформированию ядрышек в дочерних ядрах предшествует появление в анафазных клетках телец, которые принято называть «цитоплазматическими дериватами ядрышка» — ЦЯД (NDF, nucleolus derived foci) (Dundr et al., 1997; Жарская, Зацепина, 2005). ЦЯД следует отличать от «проядрышек» или «предъядрышек» (prenucleolar bodies, PNBs), впервые описанных методами электронной микроскопии как фибриллярно-гранулярные образования, формирующиеся в ядрах телофазных клеток до появления в них морфологически выраженных ядрышек (Ченцов, Поляков, 1974).

Позднее с помощью иммуноцитохимии и антител к различным белкам было установлено, что как проядрышки, так и ЦЯД содержат белки зрелых интерфазных

ядрышек, участвующие в процессинге рРНК, но не содержат белков, участвующих в регуляции транскрипции рДНК (например, UBF). К таким белкам, в частности, относятся B23 (фактор сборки рибосомных частиц), фибрилларин (белок раннего процессинга пре-рРНК), C23 (участвует в процессинге рРНК), Nor52 (предположительно участвует в поздних стадиях созревания рДНК) и некоторые другие (Ochs et al., 1985; Jimenes-Garsia et al., 1989; Dundr et al., 1997; Zatssepina et al., 1997c; Мухарьямова и др., 1998; Dundr, Olson, 1998; Fomproix et al., 1998; Savino et al., 1999). По-видимому, проядрышки и ЦЯД не различаются и по составу РНК: методом гибридизации *in situ* в обоих типах структур выявлены частично процессированные рРНК и мякРНК (Azum-Gelade et al., 1994; Jimenez-Garsia et al., 1994; Beven et al., 1996; Dundr, Olson, 1998).

Путем экспрессии белков-маркеров ЦЯД, слитых с зеленым флуоресцирующим белком, было установлено, что ЦЯД способен мигрировать в зону реформирующегося ядра, а их содержимое, по-видимому, утилизируется при восстановлении дочерних ядрышек (Dundr et al., 2000). Есть основания полагать, что содержимое проядрышек также служит для реформирования ядрышек (Dundr et al., 2000; Savino et al., 2001). Таким образом, на сегодняшний день описаны основные молекулярные характеристики митотических предшественников ядрышка и получены данные об их возможной функции — участии в телофазном реформировании ядрышек. Однако в современной литературе полностью отсутствуют сведения о молекулярных механизмах, которые контролируют образование ядрышковых предшественников в строго определенные периоды митоза.

Ранее нами показано, что структуры, напоминающие по своим свойствам и составу проядрышки, могут быть индуцированы в ядрах интерфазных клеток нескольких культур млекопитающих с помощью обратимого воздействия растворов низкой ионной силы на живые клетки (Дудник, Зацепина, 1995; Zatssepina et al., 1997b, 1997c). В частности, было показано, что индуцированные проядрышки содержат белок B23 и РНК, но лишены UBF. В настоящей работе мы разработали подход для преждевременной индукции с помощью гипотонического шока ЦЯД в метафазных клетках двух культур клеток млекопитающих. По составу белков и чувствительности к обработке РНКазой А они не отличаются от ЦЯД, которые обычно формируются в клетках тех же культур в анафазе нормального митоза (Жарская, Зацепина, 2005).

## Материал и методика

Клетки культуры зеленой мартышки CV1 выращивали в смеси сред ДМЕМ и F12 (1:1) с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки телянка (HyClone, США), глутамина и антибиотиков в стандартных концентрациях. Клетки HeLa выращивали в среде ДМЕМ с добавлением 5 % эмбриональной сыворотки телянка (HyClone) и остальных добавок, как указано выше. Клетки выращивали на покровных стеклах при 37 °C и 5 % CO<sub>2</sub> и использовали в экспоненциальной фазе роста (обычно на 2-е сут после посадки). Блок клеток в митозе вызывали инкубацией с 50 нг/мл нокадазола (Sigma, США) в течение 10—12 ч. Известно, что при такой продолжительности К-митоза активность *cdk1* сохраняется (Sirri et al., 2000).

Антитела, использованные в работе: кроличьи поликлональные антитела к специфическому фактору

транскрипции рДНК — белку UBF (Santa Cruz, Германия); аутоиммунная сыворотка к фибрилларину, полученная от больного системной склеродермией (Мухарьямова и др., 1998); мышинные моноклональные антитела к B23/нуклеофозмину (Zatssepina et al., 1999); мышинные моноклональные антитела к нуклеолину (предоставлены д-ром М. О. Дж. Ольсоном, Университет г. Джексона, Миссисипи, США). В качестве вторичных антител (конъюгатов, меченных флуорохромами) использовали антитела к иммуноглобулинам мыши, человека и кролика, меченные FITC (флуоресцеинизотиоцианат) или Texas Red (JacksonImmunoResearch Lab., США).

Обратимое воздействие гипотонического шока. Клетки CV1 или HeLa отмывали от культуральной среды в 0.1 М PBS (140 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 1.5 мМ KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> и 8.1 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.2—7.4), а затем помещали в BS, разведенный дистиллированной водой в соотношении : 5 (0.002 М PBS, pH 7.2—7.4), на 5—60 мин при 37 °C. После этого клетки возвращали в культуральную среду полного состава и инкубировали в течение 5—20 мин в стандартных условиях (см. выше). Клетки фиксировали 3 %-ным параформальдегидом, разведенным на 0.1 М PBS, и использовали для иммуноцитохимического окрашивания. Клетки, подвергнутые воздействию только гипотонического раствора, фиксировали 3 %-ным параформальдегидом на PBS соответствующей молярности.

Обработка клеток РНКазой А. Нормальные или подвергнутые гипотоническому воздействию клетки фиксировали 2 %-ным параформальдегидом на PBS в течение 10 мин и тщательно промывали PBS, чтобы полностью удалить остатки фиксатора. Клетки помещали в 0.1 М PBS, содержащий 1 мг/мл РНКазы А (Sigma), 0.1 мМ PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride, Sigma), на 60 мин при 37 °C (Жарская и др., 2002). В альтернативе нефиксированные клетки обрабатывали 0.1 %-ным Тритоном X-100 на PBS 3 мин при 4 °C и помещали в раствор РНКазы А в конечной концентрации 200 мкг/мл на 10 мин при 37 °C. Далее клетки фиксировали 2 %-ным параформальдегидом на 0.1 М PBS, как описано выше. Перед использованием РНКазы А была инактивирована нагреванием при 60 °C в течение 30 мин для удаления возможной ДНКазной активности.

Иммуноцитохимия. Фиксированные клетки обрабатывали 0.2 %-ным Тритоном X-100 на PBS в течение 7 мин при комнатной температуре, тщательно отмывали от детергента и инкубировали с первичными антителами, а затем со вторичными антителами, взятыми при их оптимальных разведениях. Перед заключением в Мовиол клетки инкубировали с красителем на хроматин DAPI (0.1 мкг/мл; Sigma, США) в течение 10 мин. Препараты изучали с помощью светового микроскопа Аксיוверт 200 («Карл Цейс», Германия), используя объективы Флуар 100 ×/ЧА 1.25 и соответствующие наборы фильтров. Изображения записывали с помощью 13-битной черно-белой камеры CoolSnap<sub>si</sub> (Roper Scientific, США) и переводили в псевдоцвета с помощью программы AdobePhotoshop, версия 6.0.

## Результаты

Ранее нами было показано, что в клетках зеленой мартышки CV1 и HeLa ЦЯД образуются на стадии ранней анафазы, основным морфологическим признаком ко-

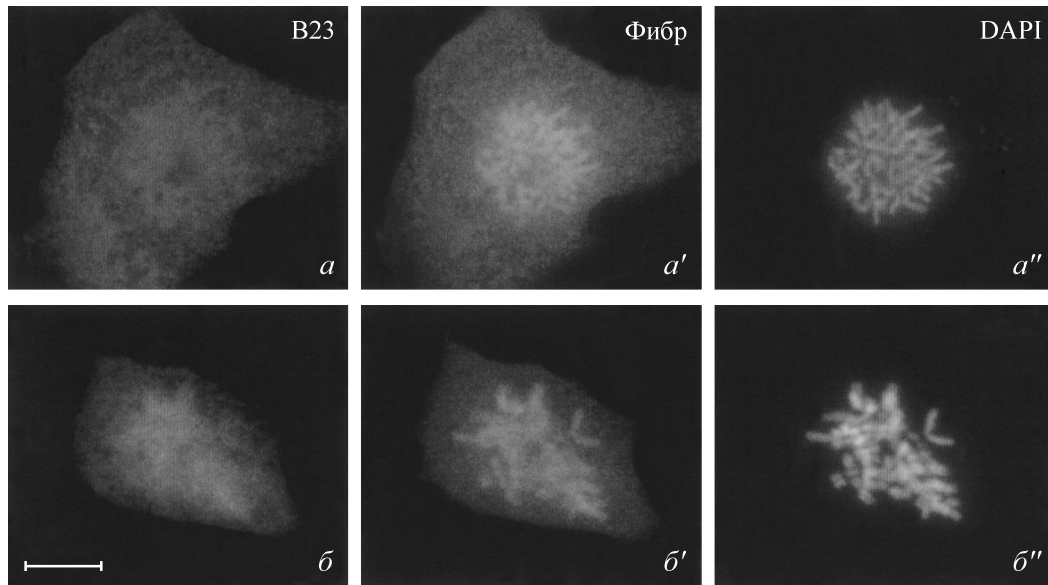


Рис. 1. Воздействие 0.02 М PBS на метафазные клетки CV1 в течение 15 (*a*—*a''*) и 30 (*б*—*б''*) мин.

Окраска антителами к B23 (*a*, *б*) и фибрилларину (*a'*, *б'*); *a''*, *б''* — окраска хромосом красителем DAPI. Индукция ЦЯД не происходит, белки располагаются в цитоплазме и декорируют хромосомы. Масштабная линейка — 10 мкм.

торой является начало сегрегации хромосом к полюсам клетки (Жарская, Зацепина, 2005). При иммуноокрашивании клеток антителами к белкам «зрелого» ядрышка, таким как B23, фибрилларин и нуклеолин, ЦЯД выявлялись как многочисленные округлые тельца размером 0.5—3.0 мкм. В клетках CV1 число ЦЯД составляло много десятков, в клетках HeLa их число обычно колебалось от 40 до 60. В полном соответствии с более ранними данными (Жарская, Зацепина, 2005), в настоящей работе ЦЯД не обнаруживались на всех стадиях митоза, предшествующих анафазе.

Обработка живых клеток CV1 и HeLa 0.02 М PBS в течение 5—60 мин временно блокирует клетки в метафазе (рис. 1). Эти наблюдения полностью соответствуют литературным данным, полученным на клетках других объектов (Смирнова и др., 1987; Zatssepina et al., 1997b). Воздействие гипотонии не приводило к заметным изменениям в расположении фибрилларина и B23 в цитоплазме метафазных клеток (рис. 1). Однако если после кратковременного (10—15 мин) воздействия гипотонического PBS клетки переносили в нормальную культуральную среду на 10—15 мин и после фиксации окрашивали антителами к фибрилларину, в цитоплазме метафазных клеток выявлялись многочисленные дискретные округлые тельца размером до 2—3 мкм (рис. 2). При двойном иммуномечении клеток на фибрилларин и B23 (рис. 2, *a*, *a'*; 4, *a*, *a'*), фибрилларин и нуклеолин (рис. 2, *б*, *б'*), а также фибрилларин и UBF (рис. 2, *в*, *в'*) в фибрилларин-положительных тельцах выявлялись все белки, кроме UBF. В последнем случае окрашивались только районы ядрышковых организаторов хромосом (рис. 2, *в'*). Таким образом, общая морфология и белковый состав образованных дискретных телец позволяют отождествлять их с ЦЯД, формирующимися в анафазе нормального митоза. Следует особо отметить, что в клетках, обнаруживающих дискретные тельца, сохранялось характерное для метафазы расположение хромосом в виде правильной метафазной пластинки (рис. 2, *a''*, *б''*, *в''*). В клетках с длинными и тонкими хромосомами, которые предположительно

находились в профазе или ранней прометафазе, индукции ЦЯД не наблюдалось. ЦЯД не образовывались также в цитоплазме интерфазных клеток (не иллюстрировано). Таким образом, можно заключить, что кратковременное и обратимое воздействие гипотонического шока на живые клетки является эффективным индуктором преждевременной сборки ЦЯД в метафазе митоза.

Для того чтобы проверить, входит ли в состав индуцированных ЦЯД РНК, клетки после переноса в изотоническую среду обрабатывали РНКазой А, а затем инкубировали с антителами к B23 или фибрилларину. Как видно на рис. 3, *a*, *a'*, ни в одной из метафазных клеток при различных условиях обработки РНКазой А (см. раздел «Материал и методика») ЦЯД не наблюдали. В сходных условиях обработка клеток РНКазой А также полностью блокировала окраску ЦЯД в телофазе нормального митоза (рис. 3, *б*, *б'*) и сильно ослабляла иммуномечение интерфазных ядрышек (не иллюстрировано).

Известно, что реакция клеток на растворы низкой ионной силы зависит от степени выраженности цитоскелета, а «гиперчувствительность» метафазных клеток к гипотонии может быть связана с особенностями его организации по сравнению с интерфазой (Смирнова и др., 1987). Принимая во внимание эти данные, мы изучили возможность индукции ЦЯД после останковки клеток CV1 и HeLa в К-митозе с помощью нокодазола. В присутствии цитостатика клетки находились в течение 10—12 ч. Характерная реакция К-метафазных клеток HeLa, окрашенных антителами к B23 и фибрилларину, на действие обратимого гипотонического шока показана на рис. 4, *б*, *б'*. Хорошо видно, что в К-метафазных клетках, инкубированных в 0.02 М PBS, а затем в культуральной среде полного состава, сборки ЦЯД практически не происходит. Напротив, в метафазных клетках HeLa, не обработанных цитостатиком, ЦЯД под действием обратимого гипотонического шока образуются (рис. 4, *a*, *a'*).

На препаратах метафазных клеток, используемых для анализа, всегда присутствовали многочисленные не-



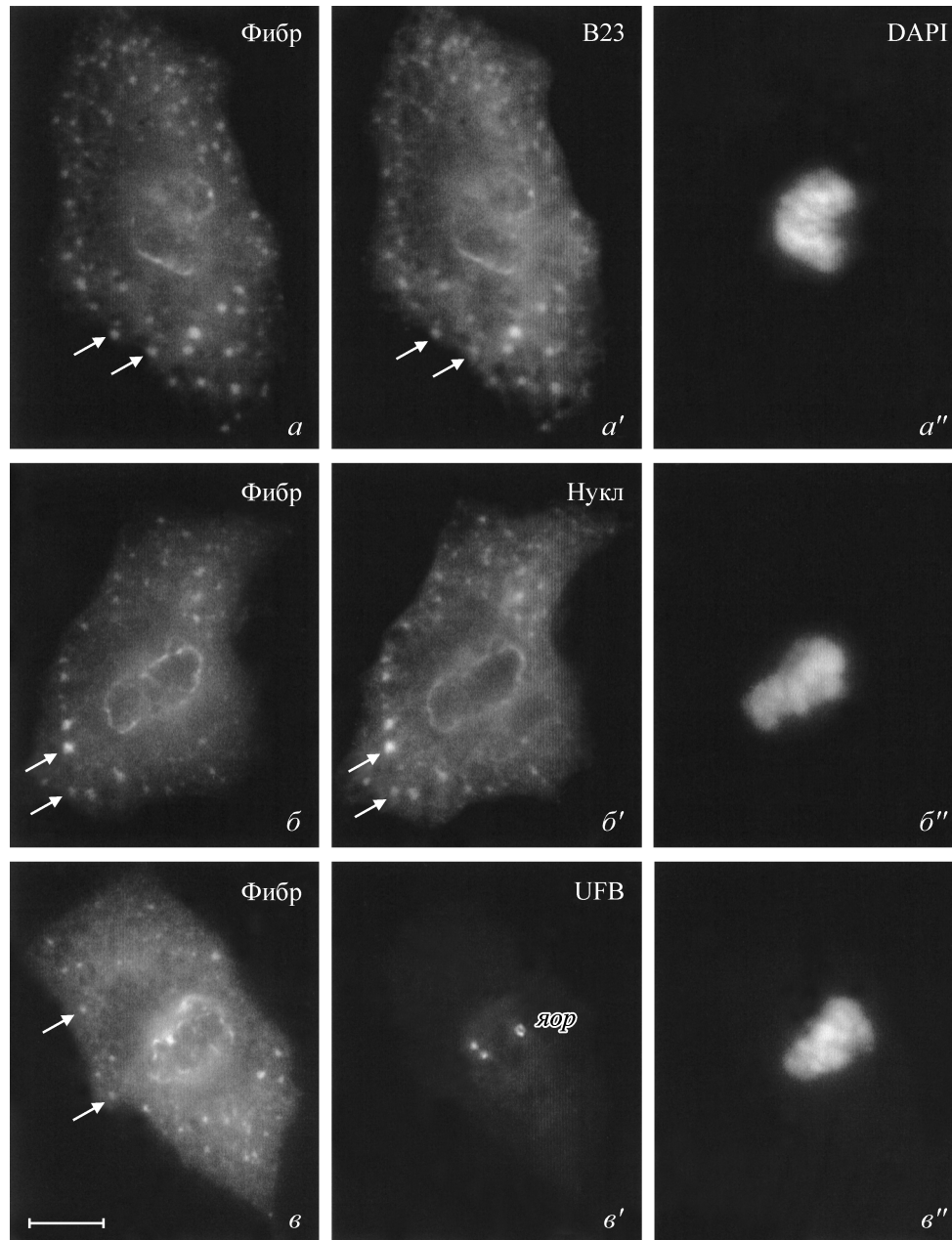


Рис. 2. Образование ЦЯД в клетках CV1 после 15-минутного воздействия 0.02 М PBS и последующей инкубации в среде полного состава в течение 15 мин.

Двойное иммуноокрашивание клеток антителами к фибрилларину (*a*) и B23 (*a'*), фибрилларину (*b*) и нуклеолину (*b'*), фибрилларину (*v*) и UBF (*v'*). *a''—v''* — окраска хромосом красителем DAPI. В цитоплазме клеток видны многочисленные дискретные частицы (*стрелки*), содержащие фибрилларин, B23 и нуклеолин, но не содержащие UBF. *ядр* — ядрышкообразующие районы хромосом. Масштабная линейка — 10 мкм.

деляющиеся клетки. В полном соответствии с литературными данными (Дудник, Зацепина, 1995; Zatssepina et al., 1997b, 1997c; Zhu et al., 1999), после обратимого гипотонического шока в ядрах интерфазных клетках собирались многочисленные дискретные тельца, которые положительно окрашивались на B23 (рис. 4, *a*). В дополнение к известным наблюдениям мы отмечаем, что обратимое воздействие гипотонического шока приводит к образованию в ядрах интерфазных клеток индуцированных «проядрышек», содержащих, кроме того, фибрилларин (рис. 4, *a'*). Характерно, что не все «проядрышки», положительно окрашивающиеся антителами на фибрилларин, содержали B23, и наоборот. Это позволяет сде-

лать вывод о том, что популяция «проядрышек» является более гетерогенной по своему составу, чем популяция ЦЯД.

### Обсуждение

Сборка ядрышка в митозе представляет собой один из завершающих этапов деления клетки, и поэтому изучение молекулярных механизмов нуклеологенеза необходимо для понимания регуляции пролиферации клеток и клеточного цикла в целом. Имеющиеся на сегодняшний день данные позволяют заключить, что решающую роль в реформировании ядрышка играет понижение об-



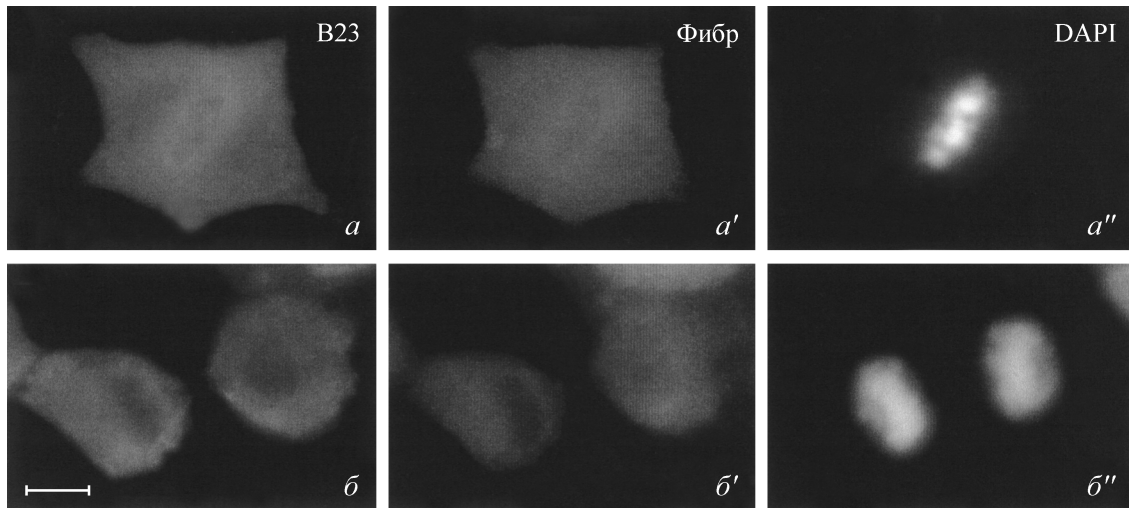


Рис. 3. Реакция метафазных клеток CV1, подвергнутых воздействию обратимого гипотонического шока ( $a$ — $a''$ ) на обработку 1 мкг/мл РНКазы А.

Двойное иммуноокрашивание антителами к B23 ( $a$ ,  $b$ ) и фибрилларину ( $a'$ ,  $b'$ ).  $a''$ — $b''$  — окраска хромосом красителем DAPI. ЦЯД не выявляются. Масштабная линейка — 10 мкм.

щего уровня фосфорилирования его белковых компонентов. Так, дефосфорилирование специфического фактора транскрипции рибосомных генов UBF в телофазе митоза является необходимым условием реактивации транскрипции рДНК (Sirri et al., 2000; Olson et al., 2002). Уровень фосфорилирования основных фосфопротеинов ядрышка B23 и C23, возрастающий при вступлении клеток в митоз, снижается при завершении клеточного деления (Peter et al., 1990). По времени этот процесс совпадает с реформированием ядрышек в дочерних клетках (Okiwaki et al., 2002). Однако остается практически неизученным вопрос о механизмах, которые регулируют сборку ядерных (проядрышки) и цитоплазматических (ЦЯД) предшественников ядрышка на завершающих стадиях

митоза. Полностью отсутствуют сведения о том, отражают ли процессы сборки ЦЯД и проядрышек изменения в уровне фосфорилирования основных фосфопротеинов, входящих в их состав, белков B23 и нуклеолина. Одним из подходов к решению этих вопросов может быть экспериментальная индукция сборки предшественников на тех стадиях клеточного цикла, когда в нормальных условиях они отсутствуют.

Ранее нами показано, что эффективным индуктором проядрышек в ядрах интерфазных клеток различных культур млекопитающих является обратимое воздействие растворов низкой ионной силы на живые клетки (Zatsepina et al., 1997b, 1997c). В настоящей работе мы впервые показали, что обратимое воздействие гипотонического

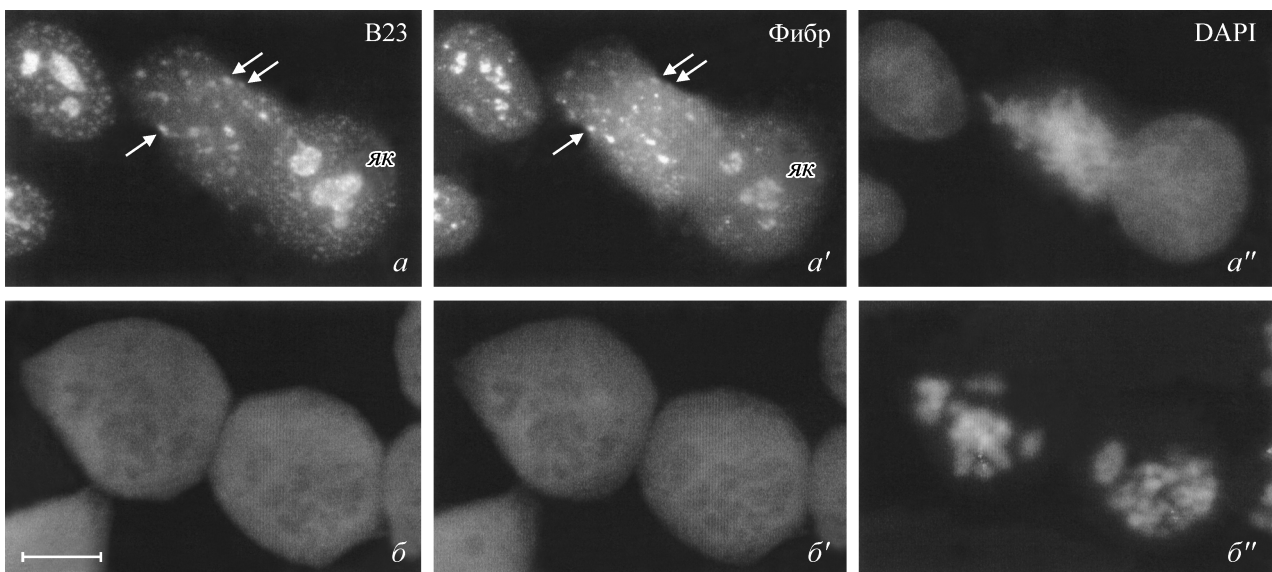


Рис. 4. Индукция образования ЦЯД в нормальных метафазных клетках HeLa с помощью обратимого гипотонического шока ( $a$ — $a''$ ) и отсутствие индукции ЦЯД в К-метафазных клетках HeLa в тех же условиях воздействия гипотонии ( $b$ — $b''$ ).

Двойное иммуноокрашивание антителами к B23 ( $a$ ,  $b$ ) и фибрилларину ( $a'$ ,  $b'$ ).  $a''$ ,  $b''$  — окраска хромосом красителем DAPI. ЦЯД указаны стрелками. В ядрах интерфазных клеток видны многочисленные «проядрышки», содержащие B23 и фибрилларин;  $як$  — ядрышки. Масштабная линейка — 10 мкм.

шока на метафазные клетки приводит к формированию структур, которые по своему составу и основным свойствам соответствуют ЦЯД, формирующимся в анафазе нормального митоза. В индуцированных ЦЯД присутствуют те же белки, что и в естественных ЦЯД, включая B23, нуклеолин и фибрилларин (рис. 2). В индуцированных ЦЯД не выявляется белок UBF, отсутствующий также в составе телофазных предшественников ядрышка. Подобно естественным ЦЯД, «дериваты», индуцированные в метафазе, чувствительны к обработке клеток РНКазой А (рис. 3, *a, a'*). Эти наблюдения находятся в полном соответствии с литературными данными о присутствии в ЦЯД рРНК (Dundr, Olson, 1998). В предыдущей работе нами было показано, что блок синтеза рРНК препятствует формированию ЦЯД (Жарская, Зацепина, 2005).

Индукция ЦЯД под действием обратимого гипотонического шока наблюдалась в цитоплазме только метафазных и поздних прометафазных клеток, но никогда не происходила на предшествующих стадиях митоза (в профазе), а также в интерфазе (рис. 4, *a, a'*). Это позволяет заключить, что одним из условий индукции ЦЯД является миграция ядрышковых белков из ядра в цитоплазму, которая происходит при разрушении ядрышка и ядерной оболочки в начале митоза. Гипотоническое воздействие, по-видимому, не индуцировало сборку ЦЯД также в анафазных и телофазных клетках, поскольку число ЦЯД в них резко не отличалось от числа ЦЯД, обычно формирующихся в анафазе и телофазе нормального митоза (не иллюстрировано). Эти наблюдения позволяют заключить, что преждевременная сборка ЦЯД отражает особенности метаболического состояния клеток и ядрышковых белков в метафазе (поздней прометафазе) митоза.

Известно, что в метафазе белки B23/нуклеофозмин, нуклеолин и фибрилларин образуют растворимые макромолекулярные комплексы, в стабилизации которых, по-видимому, принимает участие рРНК (Pinol-Roma, 1999). Есть основания полагать, что в метафазе эти комплексы находятся в растворимом состоянии, поскольку экстракция метафазных клеток растворами, содержащими детергент, препятствует иммуноочечению цитоплазмы на B23 и другие белки. Напротив, телофазные ЦЯД оказываются устойчивыми к экстракции (Zatsepina et al., 1997c). Можно заключить поэтому, что обратимое воздействие гипотонического шока на метафазные клетки вызывает переход растворимых комплексов ядрышковых белков и рРНК в нерастворимое состояние.

Каким же образом обратимое воздействие гипотонического шока на метафазные клетки индуцирует преждевременную сборку предшественников ядрышка, которая обычно имеет место в телофазе митоза? Принимая во внимание данные литературы, можно предположить, что важную роль в этом процессе играют ионы кальция. В пользу этого говорят две группы фактов. Во-первых, хорошо известно, что  $\text{Ca}^{2+}$  участвует в регуляции митоза и его завершения, когда наблюдается временное повышение концентрации свободного  $\text{Ca}^{2+}$  —  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  — в цитоплазме клеток (Baran, 1994; см. обзор: Santella, 1998). Высказано предположение о том, что один из механизмов действия ионов кальция — активация некоторых протеинкиназ (например, протеинкиназы С), которые являются негативными регуляторами  $\text{cdk1}$  (Supryniewicz et al., 1994, 2000). Как указывалось ранее, белки B23 и нуклеолин являются одними из митотических субстратов  $\text{cdk1}$ , которые дополнительно фосфорилируются  $\text{p34}^{\text{cdc}2}$  при вступлении клеток в митоз и поддерживаются этой

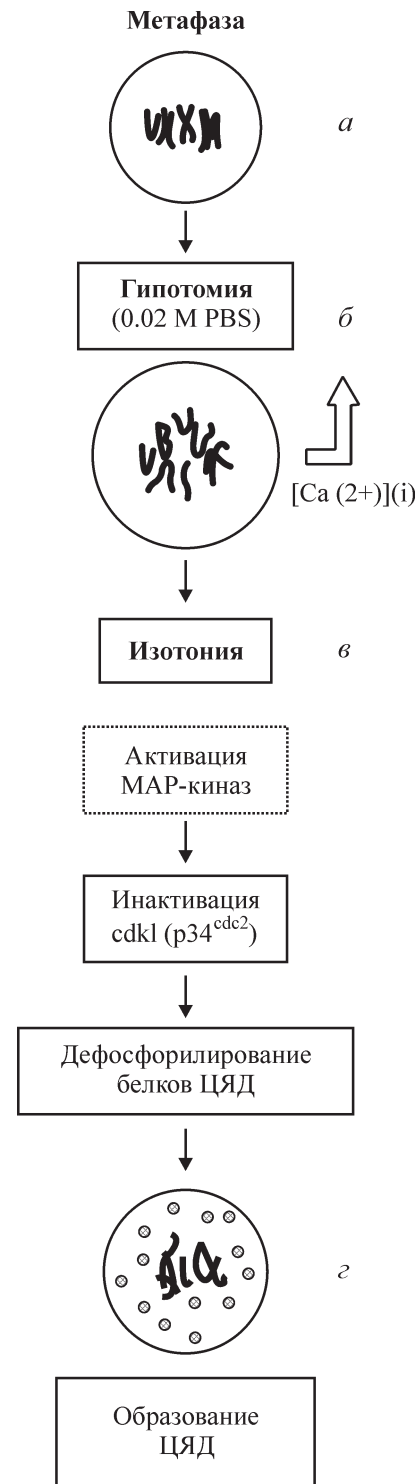


Рис. 5. Возможный механизм преждевременного образования ЦЯК под действием обратимого гипотонического шока на метафазные клетки млекопитающих.

В нормальной метафазе ЦЯК отсутствуют, а  $\text{cdk1}$  находится в активном состоянии (*a*); воздействие гипотонического раствора приводит к временному повышению концентрации свободного внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  (*b*), что при переносе клеток в изотонические условия (*в*) инициирует последовательность реакций, приводящих к инактивации  $\text{cdk1}$ , дефосфорилированию белков ЦЯД и образованию ЦЯД (*г*).

киназой в гиперфосфорилированном состоянии вплоть до окончания клеточного деления (Peter et al., 1990; Okuwaki et al., 2002). Вторая группа наблюдений показывает,

что одной из реакций интерфазных клеток на гипотонический шок является повышение  $[Ca^{2+}]_i$  за счет высвобождения  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо, а также вхождения извне (Shen et al., 2001; Hermoso et al., 2004). Можно полагать поэтому, что и в наших условиях гипотоническое воздействие приводит к повышению  $[Ca^{2+}]_i$  в цитоплазме метафазных клеток. Возрастание концентрации свободного  $Ca^{2+}$  инициирует цепь реакций, последовательными стадиями которой являются активация митогензависимых киназ, инактивация cdk1 и дефосфорилирование белков, участвующих в образовании ЦЯД. В первую очередь к таким белкам относятся фосфопротеины B23 и нуклеолин. Результатом дефосфорилирования этих белков является переход их из растворимого в нерастворимое состояние и образование аналогов телофазных ЦЯД в цитоплазме метафазных клеток. В пользу справедливости этого предположения говорят наблюдения, согласно которым в интерфазных ядрышках уровень фосфорилирования B23 ниже, чем в митозе (Peter et al., 1990; Okuwaki et al., 2002), а белок находится преимущественно в нерастворимом состоянии (Zatsepina et al., 1997a). Возможная последовательность реакций, индуцируемая действием гипотонии и приводящая к преждевременной сборке ЦЯД в метафазе, схематически изображена на рис. 5. Весьма вероятно, что повышение концентрации внутриклеточного  $Ca^{2+}$  per se не является единственным условием для начала формирования ЦЯД. Одним из дополнительных условий индукции ЦЯД с помощью обратимого гипотонического шока может быть структурная целостность цитоскелета в метафазных клетках в момент воздействия гипотонии. В пользу этого говорит тот факт, что действие нокадазола препятствует формированию индуцированных ЦЯД в цитоплазме К-метафазных клеток (рис. 4). Возможно, разрушение митотического веретена цитостатиком препятствует транспорту белков, участвующих в построении ЦЯД, и (или) изменяет свойства плазматической мембраны таким образом, что общая реакция клетки на гипотоническое воздействие резко изменяется по сравнению с нормальной метафазой.

Дальнейшие исследования будут направлены на экспериментальную проверку предложенной схемы преждевременной индукции сборки ядрышка под действием гипотонии.

Авторы выражают искреннюю благодарность д-ру М. О. Дж. Ольсону за предоставление антител к нуклеолину.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 03-04-48951).

### Список литературы

- Дудник О. А., Зацепина О. В. 1995. Поведение некоторых ядрышковых белков в условиях обратимого пространственного разобщения структурных компонентов ядрышка. Цитология. 37 (1/2): 126—132.
- Епифанова О. И. 2003. Лекции о клеточном цикле. М.: КМК Scientific Press. 98—113.
- Жарская О. О., Зацепина О. В. 2005. Закономерности образования цитоплазматических производных ядрышка в разных культурах клеток млекопитающих в митозе. Цитология. 47 (9): 780—788.
- Жарская О. О., Меджидова А. А., Федорова Н. Е., Куц А. А., Зацепина О. В. 2002. Иммуноцитохимическая реорганизация ядрышка в условиях цитомегаловирусной инфекции фибробластов эмбриона человека in vitro. Докл. РАН. 387: 589—592.
- Мухарьямова К. Ш., Дудник О. А., Сперанский А. И., Зацепина О. В. 1998. Сравнительная локализация основных белков ядрышка фибрилларина и B23 в делящихся клетках млекопитающих. Биол. мембраны. 15: 657—669.
- Смирнова Е. А., Казачкина В. И., Гребенщикова В. И., Ченцов Ю. С. 1987. Устойчивость разных типов клеток к действию гипотонии. Цитология. 29 (1): 47—53.
- Ченцов Ю. С., Поляков В. Ю. 1974. Ультраструктура клеточного ядра. М.: Наука.
- Azum-Gelade M. C., Noaillac-Depeyre J., Caizergues-Ferrer M., Gas N. 1994. Cell cycle redistribution of U3 snRNA and fibrillar. Presence in the cytoplasmic nucleolus remnant and in the prenucleolar bodies at telophase. J. Cell Sci. 107: 463—475.
- Baran I. 1994. Exit from mitosis induced by a calcium transient: the relation to the MPF and InsP3 dynamics. Biosystems. 33: 203—214.
- Beven A. F., Lee R., Razaz M., Leader D. J., Brown J. W., Shaw P. J. 1996. The organization of ribosomal RNA processing correlates with the distribution of nucleolar snRNAs. J. Cell Sci. 109: 1241—1251.
- Dimario P. J. 2004. Cell and molecular biology of nucleolar assembly and disassembly. Int. Rev. Cytol. 239: 99—178.
- Dundr M., Meier U., Lewis N., Rekosh D., Hammar-skjold M. L., Olson M. O. 1997. A class of nonribosomal nucleolar components is located in chromosome periphery and in nucleolus-derived foci during anaphase and telophase. Chromosoma. 105: 407—417.
- Dundr M., Misteli T., Olson M. O. J. 2000. The dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus. J. Cell Biol. 150: 433—446.
- Dundr M., Olson M. O. 1998. Partially processed pre-rRNAs preserved in association with processing components in nucleolus-derived foci during mitosis. Mol. Biol. Cell. 9: 2407—2422.
- Fomproix N., Gebrane-Younes J., Hernandez-Verdun D. 1998. Effects of anti-fibrillar antibodies on building of functional nucleoli at the end of mitosis. J. Cell Sci. 111: 359—372.
- Heix J., Zomerdijk J. C., Ravanpay A., Tjian R., Grummt I. 1997. Cloning of murine RNA polymerase I-specific TAF factors: conserved interactions between the subunits of the species-specific transcription initiation factor TIF-IB/SL1. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 94: 1733—1738.
- Hermoso M., Olivero P., Torres R., Riveros A., Quest A. F., Stutzin A. 2004. Cell volume regulation in response to hypotonicity is impaired in HeLa cells expressing a protein kinase Calpha mutant lacking kinase activity. J. Biol. Chem. 279: 17 681—17 689.
- Jimenez-Garcia L. F., Rothblum L. I., Busch H., Ochs R. L. 1989. Nucleologenesis: use of non-isotopic *in situ* hybridization and immunocytochemistry to compare the localization of rDNA and nucleolar proteins during mitosis. Biol. Cell. 65: 239—246.
- Jimenez-Garcia L. F., Segura-Valdez M. L., Ochs R. L., Rothblum L. I., Hannan R., Spector D. L. 1994. Nucleologenesis: U3 snRNA-containing prenucleolar bodies move to sites of active pre-rRNA transcription after mitosis. Mol. Biol. Cell. 5: 955—966.
- Leung A. K., Gerlich D., Miller G., Lyon C., Lam Y. W., Lleres D., Daigle N., Zomerdijk J., Ellenberg J., Lamond A. I. 2004. Quantitative kinetic analysis of nucleolar breakdown and reassembly during mitosis in live human cells. J. Cell Biol. 166: 787—800.
- Ochs R. L., Lischwe M. A., Shen E., Carroll R. E., Busch H. 1985. Nucleologenesis: composition and fate of prenucleolar bodies. Chromosoma. 92: 330—336.
- Okuwaki M., Tsujimoto M., Nagata K. 2002. The RNA binding activity of a ribosome biogenesis factor, nucleophosmin/B23, is modulated by phosphorylation with a cell cycle-dependent kinase and by association with its subtype. Mol. Biol. Cell. 13: 2016—2030.



- Olson M. O., Hingorani K., Szebeni A. 2002. Conventional and nonconventional roles of the nucleolus. *Int. Rev. Cytol.* 219 : 199—266.
- Peter M., Nakagawa J., Doree M., Labbe J. C., Nigg E. A. 1990. Identification of major nucleolar proteins as candidate mitotic substrates of cdc2 kinase. *Cell.* 60 : 791—801.
- Pinol-Roma S. 1999. Association of nonribosomal nucleolar proteins on ribonucleoprotein complexes during interphase and mitosis. *Mol. Biol. Cell.* 10 : 77—90.
- Santella L. 1998. The role of calcium in the cell cycle: facts and hypotheses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244 : 317—324.
- Savino T. M., Bastos R., Jansen E., Hernandez-Verdun D. 1999. The nucleolar antigen Nop52, the human homologue of the yeast ribosomal RNA processing RRP1, is recruited at late stages of nucleologenesis. *J. Cell Sci.* 112 : 1889—1900.
- Savino T. M., Gebrane-Younes J., De Mey J., Sibarita J. B., Hernandez-Verdun D. 2001. Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells. *J. Cell Biol.* 153 : 1097—1110.
- Shen M. R., Chou C. Y., Browning J. A., Wilkins R. J., Ello-ry J. C. 2001. Human cervical cancer cells use Ca<sup>2+</sup> signalling, protein tyrosine phosphorylation and MAP kinase in regulatory volume decrease. *J. Physiol.* 537 : 347—362.
- Sirri V., Roussel P., Hernandez-Verdun D. 2000. *In vivo* release of mitotic silencing of ribosomal gene transcription does not give to precursor ribosomal RNA processing. *J. Cell Biol.* 148 : 259—270.
- Suprynowicz F. A., Groigno L., Whitaker M., Miller F. J., Shuder G., Sturrock J., Whalley T. 2000. Activation of protein kinase C alters p34(cdc2) phosphorylation state and kinase activity in early sea urchin embryos by abolishing intracellular Ca<sup>2+</sup> transients. *Biochem. J.* 349 : 489—499.
- Suprynowicz F. A., Prusmack C., Whalley T. 1994. Ca<sup>2+</sup> triggers premature inactivation of the cdc2 protein kinase in permeabilized sea urchin embryos. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 91 : 6176—6180.
- Zatsepina O. V., Dudnic O. A., Chentsov Yu. S., Thiry M., Spring H., Trendelenburg M. F. 1997a. Reassembly of functional nucleoli following in situ unraveling by low-ionic-strength treatment of cultured mammalian cells. *Exp. Cell Res.* 233 : 155—168.
- Zatsepina O. V., Dudnic O. A., Todorov I. T., Thiry M., Spring H., Trendelenburg M. F. 1997b. Experimental induction of prenucleolar bodies (PNBs) in interphase cells: interphase PNBs show similar characteristics as those typically observed at telophase of mitosis in untreated cells. *Chromosoma.* 105 : 418—430.
- Zatsepina O. V., Rousselet A., Chan P. K., Olson M. O., Jordan E. G., Bornens M. 1999. The nucleolar phosphoprotein B23 redistributes in part to the spindle poles during mitosis. *J. Cell Sci.* 112 : 455—466.
- Zatsepina O. V., Todorov I. T., Philipova R. N., Krachmarov C. P., Trendelenburg M. F., Jordan E. G. 1997c. Cell cycle-dependent translocations of a major nucleolar phosphoprotein, B23, and some characteristics of its variants. *Eur. J. Cell Biol.* 73 : 58—70.
- Zhu Y., Lu D., DiMario P. 1999. Nucleolin, defective for MPF phosphorylation, localizes normally during mitosis and nucleologenesis. *Histochem. Cell Biol.* 111 : 477—487.

Поступила 4 XI 2004

PREMATURE ASSEMBLY OF NUCLEOLUS-DERIVED FOCI INDUCED BY A REVERSIBLE HYPOTONIC SHOCK TREATMENT OF METAPHASE CV1 AND HeLa CELLS

O. O. Zharskaya, O. V. Zatsepina<sup>1</sup>

A. N. Belozersky Institute of Physical and Chemical Biology, Moscow State University,  
and M. M. Shemyakin—Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow;

<sup>1</sup> e-mail: zatsepina\_olga@mail.ru

The assembly of nucleolus-derived foci (NDF) in the cytoplasm of telophase cells is an early stage of nucleolus reassembly during mitosis. In current literature, significant attention is paid to the molecular composition of NDF and their participation in reassembly of the mature nucleolus. However, very little is known about mechanisms controlling the NDF formation. The authors have demonstrated for the first time that a reversible action of low ionic strength buffers (hypotonic shock treatment) on living mitotic human HeLa and green monkey CV1 cells triggers a premature assembly of NDF at metaphase. Like the true NDF, i. e., those assembled in telophase mitosis, NDF prematurely induced at metaphase contain RNA and proteins required for rRNA processing (fibrillarin, B23/nucleophosmin, C23/nucleolin), but lack UBF, an auxiliary factor of RNA polymerase I. We have assumed that a reversible action of hypotonic shock on metaphase cells may result in temporal increase in intracellular [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> that, in its turn, may induce a premature assembly of NDF under isotonic conditions. The structural integrity of the mitotic spindle apparently plays an essential role in the response of metaphase cells to hypotonic shock treatments.

Key words: nucleolus, mitosis, nucleolus-derived foci, mechanisms of the NDF assembly.