

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ПОДАВЛЕНИЯ ОБЩЕГО УРОВНЯ СИНТЕЗА БЕЛКА, ВЫЯВЛЯЕМЫЕ С ПОМОЩЬЮ НОВЫХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

© А. А. Григорьев,^{1,2} Т. И. Булычева,² Е. В. Шеваль,³ И. А. Калинина,² О. В. Зацепина^{1,3,*}

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН,

² Гематологический научный центр РАМН, Москва, ³ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета;

* электронный адрес: zatsepin@ibch.ru, zatsepina_olga@mail.ru

Описывается реакция ядрышка на ингибирование синтеза белка, проявляющаяся при иммуноочечении клеток человека HeLa новыми моноклональными антителами АЗ. В ядрышках нормальных клеток АЗ-антиген выявляется в составе многочисленных фокусов, а в метафазных хромосомах — в одиночных фокусах, чувствительных к воздействию пепсина и не чувствительных к обработке клеток РНКазой А, что говорит о его белковой природе. На ультраструктурном уровне АЗ-антиген локализуется преимущественно на периферии фибриллярных центров. В совокупности эти свойства АЗ-антигена позволяют отнести его к молекулярным компонентам транскрипционного комплекса РНК-полимеразы I. Удивительным свойством АЗ-антигена является способность к миграции из ядрышка в дискретные фокусы в нуклеоплазме при ингибировании синтеза белка анизомицином, пурамицином или циклогексимидом. Полученные результаты позволяют рассматривать расположение антигена ядрышка, выявляемого новым антителом АЗ, как цитологический признак общего уровня синтеза белка в клетках человека *in vitro*.

Ключевые слова: мышинные моноклональные антитела АЗ, ядрышко, транскрипционный комплекс РНК-полимеразы I, анизомицин, пурамицин, циклогексимид.

Принятые сокращения: ДАПИ — 4',6-диамидино-2-фенилиндиол, ПФК — плотный фибриллярный компонент, пре-рРНК — 47—45S рРНК, рДНК — рибосомная ДНК, рРНК — рибосомная РНК, ЯОР — ядрышкообразующий район хромосомы, ФЦ — фибриллярный центр, PBS — стандартный фосфатный буферный раствор.

Ядрышко — наиболее крупный структурный домен ядра эукариотической клетки, основной функцией которого является участие в синтезе рибосом. Образование рибосом — это сложный процесс, включающий в себя три основных этапа: транскрипцию рибосомных генов (рДНК), созревание первичных 45—47S-транскриптов рРНК (пре-рРНК) и сборку рибосомных частиц. Согласно существующим представлениям, каждый из этих этапов контролируется специфическим набором белков, которые в совокупности составляют треть из приблизительно 700 белков, выявляемых в ядрышках клеток человека HeLa методом масс-спектрометрии (Andersen et al., 2005). К настоящему времени наиболее хорошо охарактеризованы белки, принимающие участие в регуляции транскрипции рибосомных генов (рДНК). В клетках человека помимо самой РНК-полимеразы I, состоящей из 13 субъединиц, к ним также относятся специфический ко-фактор РНК-полимеразы I, белок UBF и селективный фактор SL1, который в свою очередь состоит из ТВР (TATA-binding protein) и как минимум трех факторов, ассоциированных с ТВР (ТВР-associated factors, TAFs), (Russell, Zomerdijk, 2005). Общим свойством белков, входящих в состав транскрипционного комплекса РНК-полимеразы I, резко отличающим их от других ядрышковых белков, является прочная связь с рДНК. Эта связь сохраняется как в активных ядрышках в интерфазе, так и после обработки клеток

ингибиторами синтеза рРНК (например, актиномицином Д), а также во время митоза, когда транскрипция рДНК прекращается естественным образом (Жарская, Зацепина, 2007). В митозе белки-регуляторы транскрипции рДНК остаются связанными с ядрышкообразующими районами (ЯОР) хромосом, что легко выявляется при иммуноокрашивании клеток антителами к РНК-полимеразе I или UBF (Zatsepina et al., 1993; Roussel et al., 1996; Leung et al., 2004; Russell, Zomerdijk, 2006). Методами ультраструктурной иммуноцитохимии белки, входящие в состав транскрипционного комплекса РНК-полимеразы I, выявляются в фибриллярных центрах (ФЦ) и(или) на границе между ФЦ и плотным фибриллярным компонентом (ПФК), где происходит синтез пре-рРНК (Raska et al., 1995).

Одним из важнейших свойств ядрышка является его высокая структурная и функциональная изменчивость, которая отражает общий уровень метаболизма и способность клеток к пролиферации. В пролиферирующих клетках ядрышки обладают крупными размерами, многочисленными и мелкими ФЦ и содержат больше Ag-позитивных ЯОР, чем ядрышки клеток, находящихся в состоянии пролиферативного покоя (Roussel et al., 1994; Horkey et al., 2002). По этой причине состояние ядрышек и ЯОР хромосом принимаются во внимание при прогнозировании течения онкологических и некоторых других заболеваний.

Хорошо известно также, что структура и активность ядрышек изменяются в ответ на многие внешние воздействия. Изменения ядрышек проявляются, в частности, при ингибировании транскрипции рДНК (Shav-Tal et al., 2005), облучении ультрафиолетом (Zatsepina et al., 1989; Scott et al., 2001), обработке ингибиторами внутриклеточных киназ (α -аманитин, DRB и росковитин) (David-Pfeuty et al., 2001; Rubbi, Milner, 2003; Wojciechowski et al., 2003; Жарская, Зацепина, 2007) и ядерных протеасом (Chatterjee, Fisher, 2003). Однако в современной литературе практически отсутствуют сведения о реакции ядрышка на действие ингибиторов белкового синтеза, несмотря на то что многие из них вызывают гибель клеток путем апоптоза и рассматриваются в качестве химиотерапевтических реагентов в некоторых экспериментальных моделях (Rüller et al., 1999).

Одним из основных «инструментов» для изучения ядрышка являются антитела к его основным белкам. С их помощью впервые были описаны такие ядрышковые белки, как белок раннего процессинга рРНК фибрилларин (Ochs et al., 1985), белок позднего процессинга рРНК Nop52 (Savino et al., 1999) и белок с неизвестными свойствами Ki-67, располагающийся в ядрышках только пролиферирующих клеток (Gerdes et al., 1983). Однако набор антител к ядрышковым белкам, которые обладают высокой иммунореактивностью на цитологическом уровне или узнают антигены с иными интересными свойствами (например, обладающие видоспецифичностью), является в настоящее время крайне ограниченным. В связи с этим получение новых антител к ядрышку представляет несомненный интерес.

В настоящей работе описано новое моноклональное антитело, специфически реагирующее с ядрышковым антигеном (антигенами) в клетках человека и обезьяны (зеленой мартышки), который по своим иммуноцитохимическим свойствам относится к компонентам транскрипционного комплекса РНК-полимеразы I. Удивительным свойством АЗ-антигена является его способность мигрировать из ядрышек в нуклеоплазму под действием ингибиторов трансляции, что предшествует гибели клеток путем апоптоза. Это позволяет рассматривать локализацию АЗ-антигена в качестве индикатора общего уровня синтеза белка в опухолевых клетках человека HeLa.

Материал и методика

Клетки человека HeLa и других видов млекопитающих (кроме CV1 зеленой мартышки) выращивали в среде DMEM в присутствии 10 % сыворотки крупного рогатого скота, глутамина, стрептомицина и пенициллина в стандартных концентрациях. Клетки В-лимфобластоидных линий Daudi и Ramos выращивали в среде RPMI, CV1 — в смеси сред DMEM и F12 (1 : 1), содержащих 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, глутамин и антибиотики. Лимфоциты периферической крови здоровых доноров были представлены Гематологическим научным центром РАМН (ГНЦ РАМН, Москва).

Получение гибридомы. В качестве иммуногена использовали фракцию ядер, изолированных из клеток Ramos, находящихся в логарифмической фазе роста, путем лизиса клеток в 0.1%-ном растворе неионного детергента Нонидет Р-40 (NP-40). Мышей линии Balb/c четырехкратно иммунизировали по схеме, описанной ранее (Булычева и др., 2000; Dergunova et al., 2002), после чего

сенсibilизированные лимфоциты селезенки сливали с клетками мышиной миеломы линии P3-X63-Ag8.653 в соотношении 3 : 1. В качестве сливающего агента использовали 50%-ный раствор полиэтиленгликоля с мол. массой 3000—3700 Да. После завершения процедуры слияния гибридные клетки культивировали в 96-луночных плоскодонных планшетах ($0.2 \cdot 10^6$ клеток на 1 ячейку) в среде DMEM, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, глутамин и антибиотики в стандартных концентрациях, в присутствии ГАТ (10^{-4} М гипоксантина, $7 \cdot 10^{-7}$ М аминоптерина и 10^{-5} М тимидина) (ПанЭко, Россия). Отбор клонов (продуцентов антител) производили путем скрининга культуральных жидкостей из лунок, давших рост гибридным клонам, в реакции непрямой иммунофлуоресценции на клетках Ramos, зафиксированных абсолютным ацетоном при 4 °С в течение 10 мин. Гибридные клетки шестикратно клонировали методом лимитирующих разведений и выводили в массовую культуру. В результате был получен штамм гибридных клеток, названный АЗ, продуцирующий антитела к ядрышку. Для повышения концентрации антител клетки гибридомы АЗ выращивали в виде асцитной опухоли в брюшной полости мышей F₁ DBA × Balb/c после предварительного введения пристана и облучения в дозе 400 рад. Более подробно условия иммунизации животных описаны в работе Булычевой с коллегами (2000). Антиген, выявляемый антителом АЗ, в настоящей работе назван АЗ-антигеном.

Непрямая иммунофлуоресценция. Клетки для экспериментов выращивали на покровных стеклах и использовали в экспоненциальной фазе роста (обычно на 2-е сут после посева). Контрольные клетки фиксировали 2%-ным параформальдегидом на 0.1 М стандартном фосфатном буфере (PBS; 2.7 мМ KCl, 0.14 М NaCl, 8.1 мМ Na₂HPO₄ · 12H₂O и 1.5 мМ KH₂PO₄) в течение 20 мин, обрабатывали 0.5%-ным Тритоном X-100 (10 мин), отмывали PBS и инкубировали во влажной камере с антителами в течение 1 ч при комнатной температуре. После тщательной отмывки в PBS клетки инкубировали с антителами к IgG мыши, конъюгированными с Cy2 (Jackson Immuno-Res. Lab., США), в течение 30—45 мин, окрашивали 0.1 мкг/мл DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол) 15 мин, отмывали в PBS и заключали в Мовиол. В параллельных экспериментах клетки HeLa фиксировали абсолютным ацетоном (4 °С, 10 мин), абсолютным метанолом (4 °С, 10 мин) или в смеси метанола (3 части) и ледяной уксусной кислоты (1 часть) (4 °С, 10 мин).

Инкубацию клеток HeLa с анизомидином (100 мкМ, Sigma), пурамицином (100 мкг/мл, Sigma) или циклогексимидом (100 мкг/мл, Sigma) производили в течение 15 мин—6 ч при 37 °С. Ранее показано, что в этих концентрациях ингибиторы практически полностью подавляют синтез белка в клетках HeLa через 15—30 мин после начала воздействия (Zinck et al., 1995; Iordanov et al., 1997). После обработки клетки фиксировали 2%-ным параформальдегидом и окрашивали антителами АЗ, как описано выше. Препараты изучали с помощью эпифлуоресцентного микроскопа Axiovert 200 (Carl Zeiss, Германия), используя фазово-контрастный объектив ПланА-похромат 100× (апертура 1.3) и соответствующий набор фильтров.

Для одновременного окрашивания клеток антителами АЗ и кроличьими антителами к белку коилину — маркеру телец Кахала (антитела любезно предоставлены д-ром А. Ламондом из Университета г. Дунди, Велико-

британия) — клетки HeLa фиксировали 2%-ным параформальдегидом, как указано выше. Далее клетки инкубировали в смеси антител к АЗ-антигену и коилину, а затем в смеси антител к IgG мыши, конъюгированных с Cy2, и иммуноглобулинам кролика, конъюгированных с Техаским красным (JacksonImmunoRes. Lab., США). Перед заключением в Мовиол клетки докрашивали DAPI.

Обработка РНКазой А и пепсином. Клетки HeLa, зафиксированные абсолютным ацетоном (10 мин, 4 °С), обрабатывали РНКазой А (1 мкм/мл, 30—60 мин, 37 °С) или пепсином (0.01 %, 1—5 мин; Sigma, США), как подробно описано ранее (Zatsepina et al., 1997; Гурченков и др., 2005). Клетки инкубировали с антителами АЗ и изучали под микроскопом, как описано выше.

Фрагментацию ядерной ДНК выявляли с помощью метода TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling), используя набор реагентов TUNEL Apoptosis Detection Kit (Upstate, США). Клетки фиксировали 4%-ным параформальдегидом на PBS в течение 15 мин, отмывали PBS 3 раза по 5 мин и обрабатывали 0.5%-ным Тритоном X-100 15 мин при комнатной температуре. В качестве позитивного контроля использовали клетки, инкубированные 60 мин в PBS, содержащем 2—5 мкг/мл ДНКазы I, а затем 15 мин в PBS без нуклеазы. Реакционную смесь готовили путем смешивания биотинилированного dUTP (Bio-dUTP), TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) и TdT-буфера в соотношении 5 : 5 : 90. На клетки наносили 50 мкл смеси на 60 мин при 37 °С. После тщательной промывки в PBS инкубировали с антителами АЗ (45 мин), а затем в смеси авидина, меченного FITC, и антител к IgG мыши, меченных Техаским красным, взятых в оптимальных соотношениях. Препараты заключали в Мовиол и изучали, как описано выше.

Электронная иммуноцитохимия. Для стандартной электронной микроскопии клетки фиксировали в 4%-ном глутаральдегиде (Fluka, США) на 0.15 М фосфатном буфере Зеренсена (рН 7.2—7.4), постфиксировали в 1%-ном растворе OsO₄ (Sigma, США), дегидратировали в серии спиртовых растворов повышающейся концентрации и оксиде пропилене и заключали в смолу Эпон 812 (Fluka, Швеция). Ультратонкие срезы, изготовленные на ультратоме LKB III, контрастировали уранил-ацетатом и азотнокислым свинцом по Рейнольдсу и изучали в электронном микроскопе HU-12 (Hitachi, Япония).

При проведении иммуноэлектронной микроскопии фиксацию и окрашивание клеток антителами к АЗ проводили в тех же условиях, что и при стандартной иммуноцитохимии. В качестве конъюгата использовали антимышиные Fab-фрагменты, конъюгированные с нанозолотом (NanoProbes, США), в разведении 1 : 250. Окрашивание проводили в течение ночи при 4 °С. После отмывки несвязавшегося конъюгата в буфере PBS, содержащем 0.1 % бычьего сывороточного альбумина (6 смен по 10 мин), клетки постфиксировали 1%-ным раствором глутаральдегида в течение 1 ч при комнатной температуре. Усиление сигнала с помощью Silver Enhancer Kit (NanoProbes, США) производили по стандартной методике (Gilevitch et al., 1995), после чего образцы обезвоживали и заключали в Эпон 812. Получение ультратонких срезов и их изучение в электронном микроскопе производили, как описано выше.

Статистическую обработку результатов производили с помощью программы Excel после анализа не менее 500 клеток на каждую точку.

Результаты

Видоспецифичность антител и локализация АЗ-антигена в контроле. В реакции непрямой иммунофлуоресценции полученное антитело окрашивало ядрышки в клетках человека вне зависимости от их происхождения и пролиферативного состояния. Окраска проявлялась в клетках HeLa, Ramos и Daudi, а также в лимфоцитах периферической крови здоровых доноров, находящихся в состоянии пролиферативного покоя. Кроме того, АЗ-антитело окрашивало ядрышки в клетках зеленой мартышки линий CV1, СМТ3 и Vero. Однако ни при каких условиях фиксации антитело не реагировало с ядрышками клеток других видов млекопитающих, включая клетки СПЭВ (свинья), NIH/3T3 и L (мышь), С6 (крыса), СНО (китайский хомячок), ВНК-21 (сирийский хомячок), РТК1 (кенгуровая крыса) и МПТР (бык). Эти данные говорят о высокой видовой и низкой тканевой специфичности эпитопа, узнаваемого антителом АЗ. Существенно, что в иммунореактивных клетках антитело окрашивало ядрышки после фиксации разными фиксаторами, включая параформальдегид, метанол, ацетон или смесь метанола и ледяной уксусной кислоты. Поскольку способность антитела узнавать ядерные антигены после фиксации в присутствии ледяной уксусной кислоты встречается крайне редко, этот факт указывает на высокую иммунореактивность эпитопа АЗ на клеточном уровне.

При всех способах фиксации пролиферирующих клеток человека АЗ-антиген выявлялся в составе дискретных (как правило, 20—100 на 1 ядро) фокусов, расположенных только в зонах ядрышек (рис. 1, а—в). В митозе АЗ-антиген формировал одиночные или парные сигналы, расположенные на хромосомах (рис. 1, г, д), которые, весьма вероятно, соответствуют ЯОР хромосом. В малоактивных ядрышках лимфоцитов периферической крови АЗ-антиген располагался в одиночных и крупных фокусах (рис. 1, е, ж). По общей морфологии эти фокусы аналогичны тем, которые выявляются при иммуномечении лимфоцитов человека антителами к РНК-полимеразе I и белку UBF, а также при Ag-ЯОР-окраске (Roussel et al., 1993). Обработка клеток пепсином (но не РНКазой А) блокировала иммуномечение ядрышек антителом АЗ, что указывает на белковую природу АЗ-антигена (не иллюстрируется).

На ультраструктурном уровне у большинства активных ядрышек АЗ-антиген выявлялся в виде скоплений, предположительно соответствующих мелким ФЦ (рис. 1, з). В менее активных ядрышках, содержащих крупные и одиночные ФЦ, метка располагалась преимущественно по периферии ФЦ (рис. 1, и).

Локализация АЗ-антигена после подавления синтеза белка. Уникальным свойством АЗ-антигена оказалось изменение его локализации после обработки клеток HeLa анизомицином, циклогексимином и пурамицином в концентрациях, практически полностью подавляющих синтез белка через 15—30 мин после начала воздействия (Jordanov et al., 1997). После обработки клеток 100 мкМ анизомицина в течение 1 ч на препаратах появлялись клетки, в которых АЗ-антиген располагался не только в ядрышках, но и в многочисленных дискретных фокусах в нуклеоплазме (рис. 2, а—в; 3, а—г). Доля таких клеток составляла около 20 % среди всей популяции (рис. 5). При увеличении времени обработки до 4 ч доля клеток с нуклеоплазматической локализацией АЗ-антигена превышала 30 % (рис. 2, г; 5). При этом во многих яд-

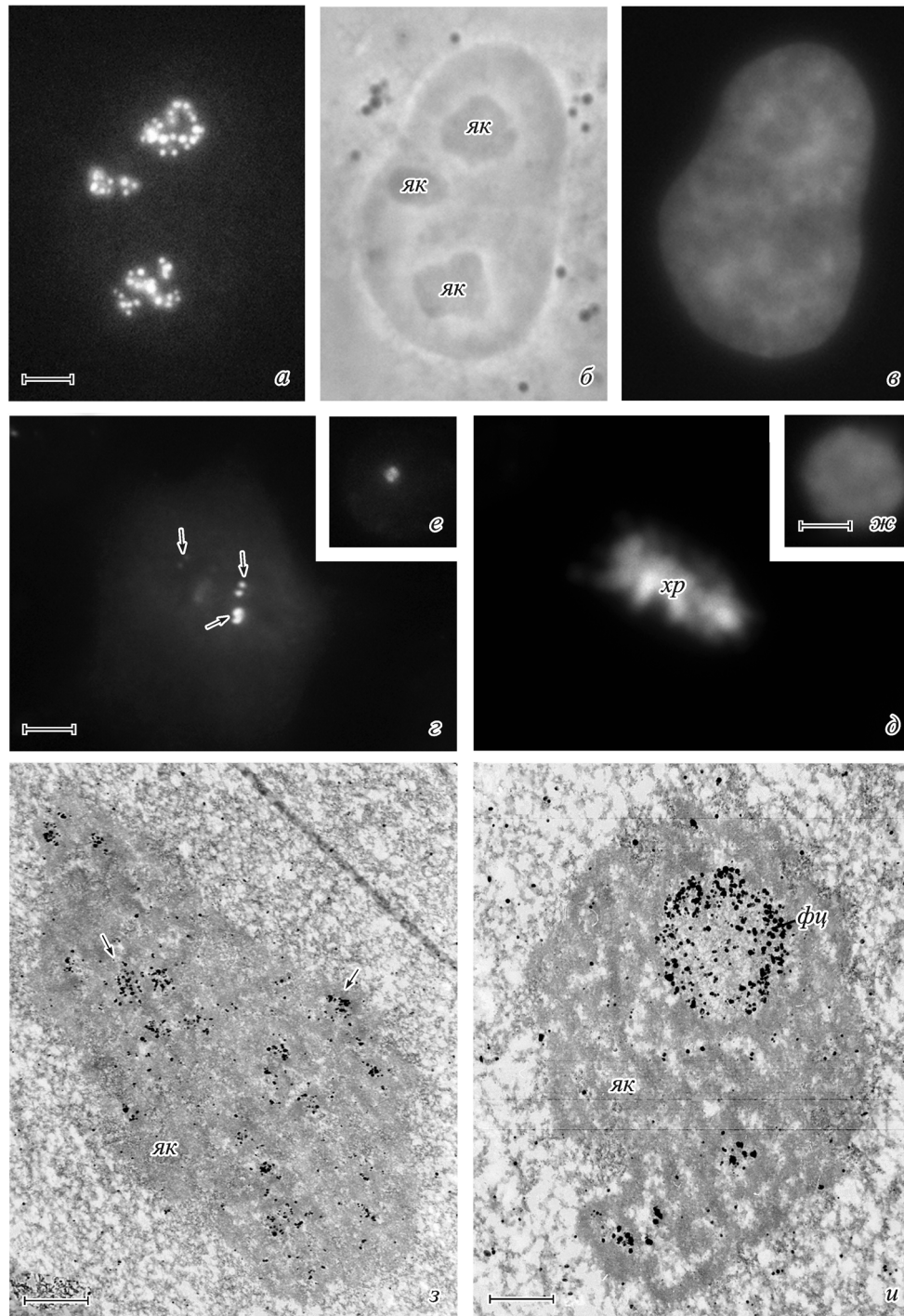


Рис. 1. Иммуномечение клеток HeLa (*a—д*, *з*, *и*) и лимфоцитов периферической крови человека (*е*, *ж*) моноклональным антителом АЗ на световом (*а*, *з*, *е*) и электронно-микроскопическом (*з*, *и*) уровнях.

б — фазовый контраст; *в*, *ж* — окрашивание ядер красителем DAPI. АЗ-антиген выявляется в многочисленных дискретных фокусах в ядрышках (*а*), в парных гранулах над митотическими хромосомами (*з*, *стрелки*), в виде одиночных и крупных гранул в ядрах лимфоцитов (*е*); *з*, *и* — АЗ-антиген формирует мелкие кластеры (*стрелки*) и располагается на периферии крупных фибриллярных центров (*фи*); *як* — ядрышко, *хр* — хромосомы. Масштаб — 2 (*а—д*), 5 (*е*, *ж*) и 0,2 (*з*, *и*) мкм.

рах преимущественного расположения АЗ-антигена в ядрышках не наблюдалось, несмотря на то что ядрышки продолжали отчетливо выявляться в режиме фазового контраста (рис. 2, *д—ж*). О сохранности ядрышек в клетках с аномальной локализацией АЗ-антигена говорили также наблюдения, сделанные с помощью ультраструктурной иммуоцитохимии (рис. 2, *з*). Как видно на рис. 2, *з*, после воздействия анизомидина АЗ-антиген при-

сутствует не только в ядрышках, но и в ядрах, где формирует дискретные скопления, аналогичные наблюдаемым методом световой иммуоцитохимии (рис. 2, *а*, *з*, *д*). Через 3—4 ч на препаратах отчетливо появлялись клетки, лишенные АЗ-антигена (рис. 3, *д*). Такие клетки характеризовались фрагментацией ядер, конденсацией хроматина и позитивно метились в реакции TUNEL, что свидетельствует о расщеплении ДНК (рис. 3, *е—з*). Поскольку

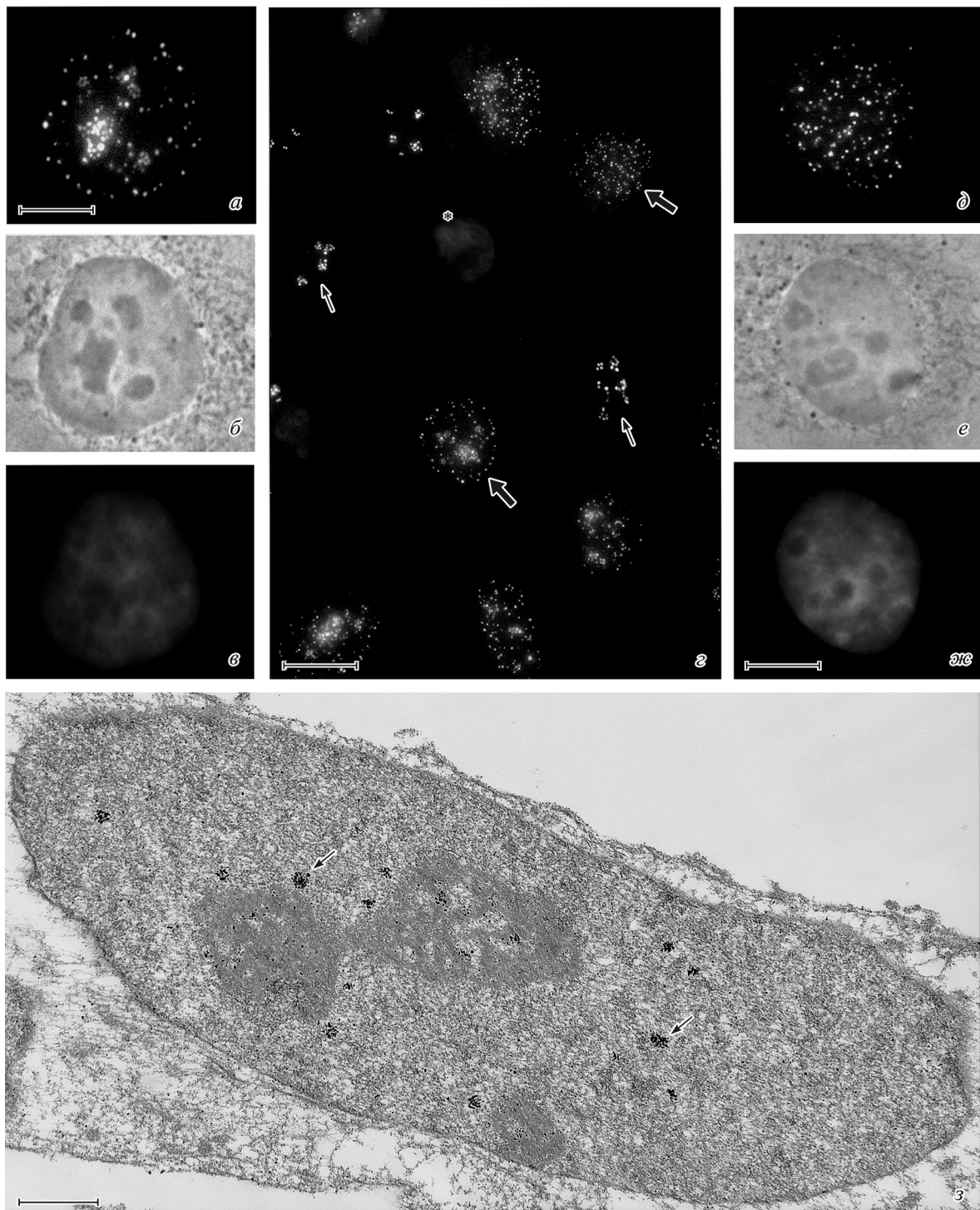


Рис. 2. Изменения в локализации А3-антигена после инкубации клеток HeLa с 100 мкМ анизомицина в течение 1 (а—в) и 4 (г—з) ч и иммуномечение антителом А3 на световом (а, г, д) и электронно-микроскопическом (з) уровнях.

а—в — А3-антиген располагается в ядрышках и нуклеоплазме; б, е — фазовый контраст; в, ж — окрашивание ядер красителем DAPI; г — гетерогенная реакция клеток на обработку анизомицином, *стрелки* — ядра с нормальной локализацией А3-антигена в ядрышках, *большие стрелки* — клетки с локализацией А3-антигена в ядерных фокусах, *звездочка* — апоптотическая клетка, в которой А3-антиген не выявляется; д—ж — А3-антиген равномерно располагается по ядру; з — А3-антиген присутствует как в ядрышках, так и в нуклеоплазме (*стрелки*); Масштаб — 5 (а—ж) и 1 (з) мкм.

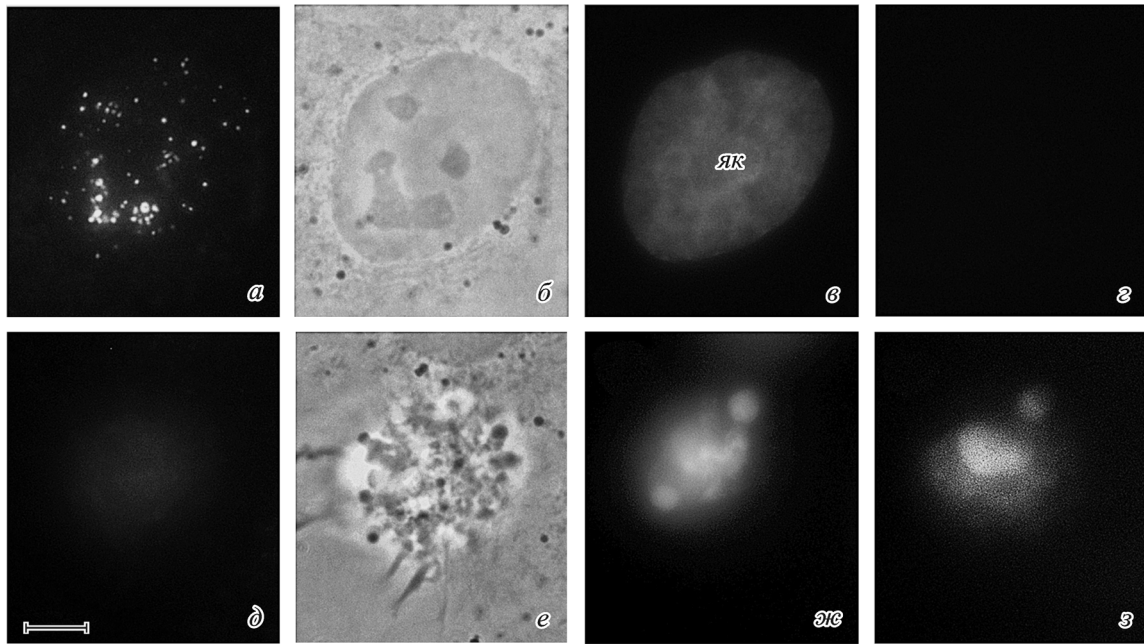


Рис. 3. Мечение клеток HeLa, обработанных анизомицином (100 мкМ, 4 ч), антителом А3 (а, д) и с помощью метода TUNEL (з, з). б, е — фазовый контраст; в, ж — окрашивание ядер красителем DAPI. Клетки с локализацией А3-антигена в ядрышках (як) и ядрах (а) имеют нормальную морфологию (б, в) и не меняются в реакции TUNEL (з); апоптотические клетки не окрашиваются антителом А3 (д), сжаты (е), содержат фрагментированные ядра (ж) и метятся в реакции TUNEL (з). Масштаб — 3 мкм.

перечисленные изменения являются признаками гибели клеток путем апоптоза (Плетюшкина и др., 2006), мы заключили, что ингибирование синтеза белка в клетках HeLa в конечном итоге приводит к апоптозу. Характерно, что клетки с аномальной локализацией А3-антигена, но обладающие нормальной морфологией ядра, методом

TUNEL не метились (рис. 3, а–з). Это наблюдение говорит о том, что миграция А3-антигена из ядрышка в нуклеоплазму не сопровождается расщеплением ДНК в ядре.

Аналогичные результаты были получены при обработке клеток HeLa другими ингибиторами трансляции — пуромицином (100 мкг/мл) и циклогексимидом (100 мкг/мл) —

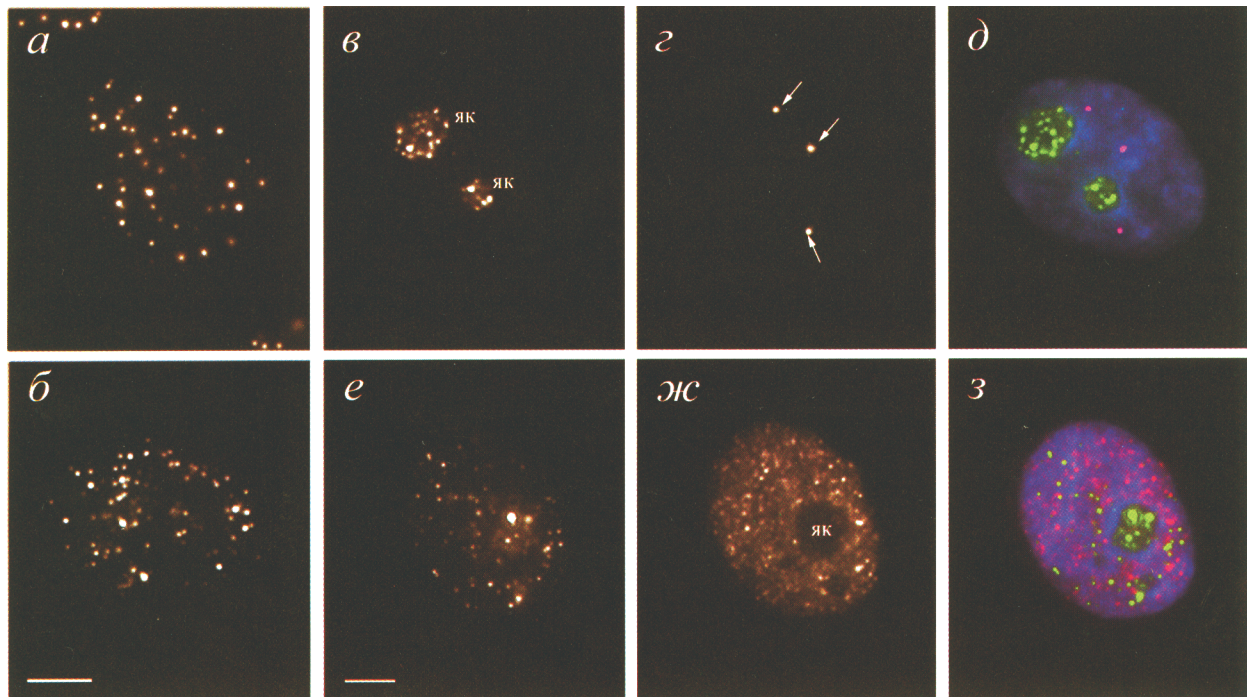


Рис. 4. Иммуномечение клеток HeLa антителом А3 (а, б, е, з) и антителом к коилину (в, ж) после обработки в течение 2 ч 100 мкг/мл циклогексимида (а), 100 мкг/мл пуромицина (б) или 100 мкМ анизомицина (е, з).

в–д — контроль; д, з — совмещение окраски на А3-антиген (зеленый цвет), коилин (красный цвет) и хроматин (синий цвет); а, б — А3-антиген располагается в дискретных фокусах, равномерно распределенных по ядру; в–з — места локализации А3-антигена не совпадают с тельцами Кахала; як — ядрышко. Масштаб — 2 мкм.

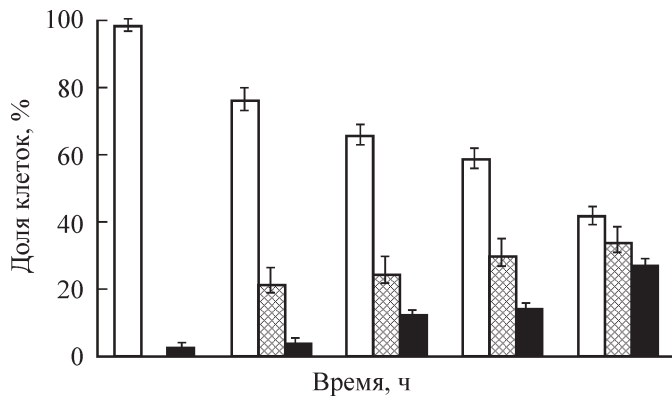


Рис. 5. Гистограмма распределения клеток HeLa нормальных (белые столбики), с ядерной локализацией А3-антигена (серые столбики) и апоптотических (черные столбики) в разные сроки после обработки их 100 мкМ аннимоцицина.

Вертикальные отрезки — стандартные отклонения от средних значений.

в течение 1—6 ч. В обоих случаях подавление синтеза белка также приводило к миграции А3-антигена из ядрышка в ядро и гибели клеток путем апоптоза (рис. 4, а, б).

Для выяснения природы ядерных фокусов, в которых локализуется А3-антиген после подавления синтеза белка, мы произвели окрашивание контрольных клеток, а также клеток, обработанных аннимоцицином, на А3-антиген и коилин — маркерный белок телец Кахала (рис. 4, в—з). Как видно на рис. 4, з, в контрольных клетках HeLa коилин присутствует в одиночных нуклеоплазматических гранулах. Обработка аннимоцицином в течение 4 ч резко увеличивала число телец Кахала (рис. 4, ж), однако места локализации коилина и А3-антигена не совпадали (рис. 4, з).

На рис. 5 представлена гистограмма, отражающая долю клеток HeLa с характерной локализацией А3-антигена в ядрышках, клеток с аномальной (нуклеоплазматической) локализацией А3-антигена и апоптотических клеток при разных сроках обработки 100 мкМ аннимоцицина.

Обсуждение

Как указывалось в разделе «Материал и методика», первичный отбор клонов-продуцентов антител А3 производили на основании характера окраски клеток человека В-лимфобластоидной линии Daudi средой культивирования гибридомных клеток. В результате был выбран клон, продуцирующий моноклональные антитела, которые с высокой специфичностью окрашивали ядрышки в этой линии клеток. Последующий анализ тканевой и видовой специфичности А3-антигена показал, что антитело А3 окрашивало ядрышки во всех клетках человека тестированных типов, включая HeLa и Ramos, а также в клетках зеленой мартышки разных линий. Способность антитела А3 окрашивать ядрышки в клетках человека и мартышки проявлялась при всех основных способах фиксации. Напротив, в тех же условиях фиксации антитело А3 не проявляло иммунореактивности в отношении клеток других видов млекопитающих, таких как мышь, крыса, кенгуровая крыса, хомячок и бык. На основании этих наблюдений был сделан вывод о том, что штамм моноклональных антител А3 узнает ядрышковый антиген (антигенную де-

терминанту), присутствующий только в клетках приматов.

Белки, участвующие в регуляции транскрипции рибосомных генов в клетках человека, включая РНК-полимеразу I, UBF, SL1 и TTF1 (фактор терминации транскрипции), относятся к одним из наиболее изученных белков ядрышка с точки зрения как их роли в биогенезе рибосом, так и свойств, проявляющихся на клеточном уровне. Показано, что белки этой группы формируют в интерфазных ядрышках характерные дискретные фокусы и ожерелье-подобные структуры (necklace-like structures) (Zatsepina et al., 1993). На ультраструктурном уровне РНК-полимераза I и UBF выявляются в ФЦ (Thiry, Lafontaine, 2005) или на границе между ФЦ и ПФК (Koberna et al., 2002). В отличие от белков ядрышка, участвующих в созревании рРНК, комплекс РНК-полимеразы I отсутствует на поверхности хромосом в митозе (DiMario, 2004). На основании этих данных был сделан вывод о том, что любой антиген белковой природы, свойства которого удовлетворяют перечисленным признакам, может быть отнесен к белкам, участвующим в транскрипции рДНК (Rendon et al., 1992; Мухарьямова и др., 1998).

В настоящей работе нами получено новое моноклональное антитело к ядрышковому антигену, свойства которого полностью соответствуют свойствам основных белков, входящих в состав транскрипционного комплекса РНК-полимеразы I. К сожалению, в стандартных условиях получения клеточных лизатов и постановки иммуноблотов с использованием антитела А3 на мембране выявляется несколько полос в диапазоне от 200 до 14 кДа, что не позволяет установить природу А3-антигена на основании его электрофоретической подвижности. Однако локализация А3-антигена в характерных кластерах в активных ядрышках (рис. 1, а, б), в одиночных или двойных фокусах, по морфологии соответствующих ЯОР хромосом в митозе (рис. 1, г, д), а также в ФЦ на ультраструктурном уровне (рис. 1, и) позволяет сделать вывод о том, что А3-антиген принадлежит к компонентам транскрипционного комплекса РНК-полимеразы I. Ранее аналогичная локализация была описана для таких белков-регуляторов транскрипции рДНК, как RPA1 (190 кДа) и RPA2 (127—116 кДа) (первая и вторая большие субъединицы РНК-полимеразы I соответственно), UBF (94—97 кДа), PAF53 (53 кДа; специфический кофактор РНК-полимеразы I), TTF1 (100—110 кДа) и три ТВР-связанных фактора — TAFI110 (110 кДа), TAFI63 (63 кДа) и TAFI48 (48 кДа). Малые субъединицы РНК-полимеразы I и ТАТА-связывающий белок ТВР (38 кДа) присутствуют еще и в нуклеоплазме, где участвуют в транскрипции структурных генов и тРНК (Russell, Zomerdiijk, 2005). Поскольку в нормальных клетках А3-антиген выявляется только в ядрышках (рис. 1, а—в), можно заключить, что он не относится к группе белков, общих для РНК-полимераз I, II и III.

Удивительное свойство А3-антигена — это способность изменять локализацию в ответ на ингибирование тотального синтеза белка аннимоцицином (100 мкМ), пурамицином (100 мкг/мл) или циклогексимидом (100 мкг/мл). Изменения в расположении А3-антигена проявлялись в его релокализации из ядрышка во множественные фокусы в нуклеоплазме, которые отчетливо выявлялись методами световой (рис. 2, а, г, д) и электронной (рис. 2, з) иммуноцитохимии. Любопытно, что в этих условиях ядрышки и ядра не проявляли видимых изменений по сравнению с контрольными клетками (рис. 1, а—в,

з; 2; 3, а—в). Согласно литературным данным, в используемых концентрациях ингибиторы полностью подавляют синтез белка в клетках HeLa через 15—30 мин после начала воздействия (Zinck et al., 1995; Jordanov et al., 2002). По нашим наблюдениям, появление АЗ-антигена в нуклеоплазме некоторых клеток наблюдалось не раньше чем через 1 ч после добавления ингибитора (рис. 5). Можно заключить поэтому, что релокализация АЗ-антигена является следствием подавления тотального синтеза белка, которое в конечном итоге приводило к гибели клеток путем апоптоза. В пользу последнего говорят такие признаки, как сморщивание клеток (рис. 3, е), фрагментация ядра и конденсация хроматина (рис. 3, ж), расщепление ДНК (рис. 3, з), проявляющиеся более чем в 30 % клеток после 4-часовой обработки анизомицином (рис. 5). Как видно на гистограмме, массовой гибели предшествовало появление клеток с аномальной — ядерной — локализацией АЗ-антигена. Это позволяет рассматривать изменения в расположении антигена, узнаваемого антителом АЗ, как предвестник апоптотической гибели, вызываемой подавлением тотального синтеза белка. Существенно, что изменения иммуноцитохимических свойств ядрышка, вызываемые подавлением белкового синтеза, являются характерными именно для ингибирования трансляции и, по нашим сведениям, не были до сих пор описаны при воздействии других индукторов апоптоза.

Несмотря на то что природа АЗ-антигена остается пока невыясненной, высокая иммуореактивность антитела АЗ и его видоспецифичность могут быть использованы для изучения механизма действия антибиотиков, способных ингибировать синтез белка в клетках приматов. Высокая специфичность АЗ-антитела к антигену в клетках человека может быть использована для выявления их возможной контаминации клетками другой видовой принадлежности, включая мышь, крысу, хомяка и др. Принимая во внимание тот факт, что локализация АЗ-антигена изменяется при подавлении синтеза белка, характер окрашивания клеток АЗ-антителом может служить в качестве нового подхода для оценки общего состояния культивируемых клеток. Так, нами показано, что продолжительное (до 6 мес) поддержание клеток HeLa в культуре сопровождается появлением многочисленных клеток, в которых АЗ-антиген располагался не только в ядрышках, но и в нуклеоплазме. Популяция, содержащая такие клетки, в целом более чувствительна к внешним стрессовым воздействиям по сравнению с культурами, лишенными клеток с аномальной локализацией АЗ-антигена (Григорьев и др., 2007).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-49392).

Список литературы

Булычева Т. И., Дергунова Н. Н., Артеменко Е. Г., Дудник О. А., Шпакова А. П., Малащенко О. С., Зацепина О. В. 2000. Анализ пролиферативной активности клеток с помощью новых моноклональных антител к ядрышковому белку B23/нуклеофозмину. Цитология. 42 (10) : 944—954.

Григорьев А. А., Жарская О. О., Булычева Т. И., Зацепина О. В. 2007. Изменения состояния ядрышка при длительном культивировании культуры клеток человека HeLa. Бюл. эксп. биол. мед. 144 (9) : 321—325.

Гурченков В. В., Ползиков М. А., Магоулс К., Романова Л. Г., Зацепина О. В. 2005. Свойства и функции нового бел-

ка ядрышка Surf-6 в клетках мыши 3Т3. Биоорганич. хим. 31 (6) : 578—585.

Жарская О. О., Зацепина О. В. 2007. Динамика и механизмы реорганизации ядрышка в митозе. Цитология. 49 (5) : 355—369.

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. Бюл. мембр. 15 (6) : 657—669.

Плетюшкина О. Ю., Фетисова Е. К., Лямзаев К. Г., Иванова О. Ю., Домнина Л. В., Высоких М. Ю., Пустовидко А. В., Алексеевский А. В., Алексеевский Д. А., Васильев Ю. М., Мерфи М. П., Черняк Б. В., Скулачев В. П. 2006. Пероксид водорода, образуемый внутри митохондрий, участвует в передаче апоптотического сигнала от клетки к клетке. Биохимия. 71 (1) : 75—84.

Andersen J. S., Lam Y. W., Leung A. K., Ong S. E., Lyon C. E., Lamond A. I., Mann M. 2005. Nucleolar proteome dynamics. Nature. 433 : 77—83.

Chatterjee T. K., Fisher R. A. 2003. Mild heat and proteotoxic stress promote unique subcellular trafficking and nucleolar accumulation of RGS26 and other RGS proteins. Role of the RGS domain in stress-induced trafficking of RGS proteins. J. Biol. Chem. 278 : 30 272—30 282.

David-Pfeuty T., Nouvian-Dooghe Y., Sirri V., Roussel P., Hernandez-Verdun D. 2001. Common and reversible regulation of wild-type p53 function and of ribosomal biogenesis by protein kinases in human cells. Oncogene. 20 : 5951—5963.

Dergunova N. N., Bulycheva T. I., Artemenko E. G., Shpakova A. P., Pegova A. N., Gemjian E. G., Dudnik O. A., Zatssepina O. V., Malashenko O. S. 2002. A major nucleolar protein B23 as a marker of proliferation activity of human peripheral lymphocytes. Immunol. Lett. 83 : 67—72.

DiMario P. J. 2004. Cell and molecular biology of nucleolar assembly and disassembly. Int. Rev. Cytol. 239 : 99—178.

Gerdes J., Schwab U., Lemke H., Stein H. 1983. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. Int. J. Cancer. 31 : 13—20.

Gilerovitch H. G., Bishop G. A., King J. S., Burry R. W. 1995. The use of electron microscopic immunocytochemistry with silver-enhanced 1.4-nm gold particles to localize GAD in the cerebellar nuclei. J. Histochem. Cytochem. 43 : 337—343.

Horký M., Kotala V., Anton M., Westerska-Gadek J. 2002. Nucleolar and apoptosis. Ann. N. Y. Acad. Sci. 973 : 258—264.

Jordanov M. S., Pribnow D., Magun J. L., Dinh T. H., Pearson J. A., Chen S. L., Magun B. E. 1997. Ribotoxic stress response: activation of the stress-activated protein kinase JNK1 by inhibitors of the peptidyl transferase reaction and by sequence-specific RNA damage to the alpha-sarcin/ricin loop in the 28S rRNA. Mol. Cell. Biol. 17 : 3373—3381.

Koberna K., Malinský J., Pliss A., Masata M., Vecerova J., Filatová M., Bedhár J., Raska I. 2002. Ribosomal genes in focus: new transcripts label the dense fibrillar components and from clusters indicative of «Christmas trees» *in situ*. J. Cell Biol. 157 : 743—748.

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., Spohn W. H., Busch H. 1985. Fibrillar: a new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera. Biol. Cell. 54 : 123—133.

Raska I., Dunder M., Koberna K., Melcák I., Risueño M. C., Török I. 1995. Does the synthesis of ribosomal RNA take place within nucleolar fibrillar centers or dense fibrillar components? A critical appraisal. J. Struct. Biol. 114 : 1—22.

Rendon M. C., Rodrigo R. M., Goenechea L. G., Garcia-Herdugo G., Valdivia M. M., Moren F. J. 1992. Characterization and immunolocalization of nucleolar antigen with anti-NOR serum in HeLa cells. Exp. Cell Res. 200 : 393—403.

Roussel P., André C., Comai L., Hernandez-Verdun D. 1996. The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in

active NORs and absent in inactive NORs. *J. Cell Biol.* 133 : 235—246.

Roussel P., André C., Masson C., Géraud G., Hernandez-Verdun D. 1993. Localization of the RNA polymerase I transcription factor hUBF during the cell cycle. *J. Cell Sci.* 104 : 327—337.

Roussel P., Sirri V., Hernandez-Verdun D. 1994. Quantification of Ag-NOR proteins using Ag-NOR staining on western blots. *J. Histochem. Cytochem.* 42 : 1513—1517.

Rubbi C. P., Milner J. 2003. Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. *EMBO J.* 22 : 6068—6077.

Rüller S., Stahl C., Köhler G., Eickhoff B., Breder J., Schlaak M., van der Bosch J. 1999. Sensitization of tumor cells to ribotoxic stress-induced apoptotic cell death: a new therapeutic strategy. *Clin. Cancer Res.* 5 : 2714—2725.

Russell J., Zomerdijk J. C. 2005. RNA-polymerase-I-directed rDNA transcription, life and works. *Trends Biochem. Sci.* 30 : 87—96.

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.

Scott M., Boisvert F. M., Vieyra D., Johnston R. N., Bazett-Jones D. P., Riabowol K. 2001. UV induces nucleolar translocation of ING1 through two distinct nucleolar targeting sequences. *Nucl. Acids Res.* 29 : 2052—2058.

Shav-Tal Y., Blechman J., Darzacq X., Montagna C., Dye B. T., Patton J. G., Singer R. H., Zipori D. 2005. Dynamic sor-

ting of nuclear components into distinct nucleolar caps during transcriptional inhibition. *Mol. Biol. Cell.* 16 : 2395—2413.

Thiry M., Lafontaine D. L. 2005. Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. *Trends Cell Biol.* 15 : 194—199.

Wojciechowski J., Horky M., Gueorguieva M., Wesierska-Gadek J. 2003. Rapid onset of nucleolar disintegration preceding cell cycle arrest in roscovitine-induced apoptosis of human MCF-7 breast cancer cells. *Int. J. Cancer.* 106 : 486—495.

Zatsepina O. V., Todorov I. T., Philipova R. N., Krachmarov C. P., Trendelenburg M. F., Jordan E. G. 1997. Cell cycle-dependent translocations of a major nucleolar phosphoprotein, B23, and some characteristics of its variants. *Eur. J. Cell Biol.* 73 : 73—58—70.

Zatsepina O. V., Voit R., Grummt I., Spring H., Semenov M. V., Trendelenburg M. F. 1993. The RNA polymerase I-specific transcription initiation factor UBF is associated with transcriptionally active and inactive ribosomal genes. *Chromosoma.* 102 : 599—611.

Zatsepina O. V., Voronkova L. N., Sakharov V. N., Chentsov Y. S. 1989. Ultrastructural changes in nucleoli and fibrillar centers under the effect of local ultraviolet microbeam irradiation of interphase culture cells. *Exp. Cell Res.* 181 : 94—104.

Zinck R., Cahill M. A., Kracht M., Sachsenmaier C., Hipskind R. A., Nordheim A. 1995. Protein synthesis inhibitors reveal differential regulation of mitogen-activated protein kinase and stress-Activated protein kinase pathways that converge on Elk-1. *Mol. Cell. Biol.* 15 : 4930—4938.

Поступила 18 IX 2007

THE CYTOLOGICAL INDICATORS OF THE OVERALL SUPPRESSION OF PROTEIN SYNTHESIS AS REVEALED BY STAINING WITH A NEW MONOCLONAL ANTIBODY

A. A. Grigoryev,^{1,2} T. I. Bulycheva,² E. V. Sheval,³ I. A. Kalinina,² O. V. Zatsepina^{1,3,*}

¹ M. M. Shemyakin—Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, ² Russian Center for Hematology RAMS, Moscow, and ³ A. N. Belozersky Institute of Physical and Chemical Biology, Moscow State University;

* e-mail: zatsepina@ibch.ru, zatsepina_olga@mail.ru

In this work we describe how the nucleolus reacts to inhibition of protein synthesis as revealed by labeling with a new monoclonal antibody A3. In normal cells A3 antigen is observed as numerous foci within the nucleolus. During mitosis A3 antigen is located in a few foci on chromosomes. Regions of A3 localization are susceptible to pepsin treatment but are not susceptible to RNase A treatment. This fact indicates that A3 antigen is of protein nature. On the ultra structural level, A3 antigen is localized primarily at the periphery of fibrillar centers. Taken together these properties of A3 antigen suggest that it's a component of the RNA polymerase I transcription machinery. A3 antigen has an intriguing property, namely, an ability to migrate from the nucleolus to the nucleoplasm upon inhibition of protein synthesis with anisomycin, puromycin or cycloheximide. The obtained results show that the localization of A3 antigen revealed by the new monoclonal antibody may serve as a cytological indicator of the overall level of protein synthesis *in vitro*.

Key words: mouse monoclonal antibody A3, nucleolus, RNA polymerase I transcription machinery, anisomycin, puromycin, cycloheximide.