

ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ НЕКОТОРЫХ БЕЛКОВ ЯДЕРНОГО МАТРИКСА В СОСТАВЕ ОКОЛОЯДРЫШКОВОГО ХРОМАТИНА

© М. И. Мурашева,¹ Ю. С. Ченцов

Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова;
¹ электронный адрес: marinak-m@mail.ru, yuchentsov@mail.ru

В ядрах интерфазных клеток культуры почки эмбриона свиньи (СПЭВ) интенсивная флуоресценция флуорохрома DAPI наблюдается на периферии ядрышек в районах околядрышкового хроматина в виде ярко флуоресцирующего ободка. Антитела к белкам с мол. массами 27, 38, 40, 50 и 65 кДа, полученные из сывороток больных аутоиммунными заболеваниями, в интерфазных клетках окрашивают только ядра в виде небольших скоплений или гранул. Они не окрашивают сами ядрышки, но выявляются на их периферии в виде ярко флуоресцирующего кольца в зоне околядрышкового хроматина. Антитела к ядрышковым белкам фибрилларину и B23 специфически окрашивают только ядрышки. В ядрах после удаления гистонов и ДНК (ядерный белковый матрикс, ЯБМ) белок фибрилларин равномерно распределен по объему остаточных ядрышек, а белок B23 обнаружен лишь на их периферии, где локализуется околядрышковый хроматин. Антитела к белкам с молекулярными массами 40, 50 и 65 кДа связываются с периферией остаточных ядрышек и в виде небольших скоплений располагаются в кариоплазме клеток. Антитела к белкам с мол. массами 27 и 38 кДа связываются только с периферией остаточных ядрышек. Установлено, что белки ядерного матрикса с мол. массами 27, 38, 40, 50 и 65 кДа, а также белок B23 входят в состав околядрышкового хроматина, который может являться особым хромосомным доменом, связанным с функционированием ядрышка.

Ключевые слова: интерфаза, ядро, ядрышко, хроматин, ядерный белковый матрикс, остаточное ядрышко, иммунохимия.

Принятые сокращения: АСМ — атомно-силовая микроскопия, СПЭВ — культура почки эмбриона свиньи, ТЭА — триэтаноламин, ЯБМ — ядерный белковый матрикс, PMSF — фенолметансульфонилфторид.

В пространстве интерфазного ядра хромосомы располагаются строго упорядоченно, что необходимо для регуляции процессов репликации и транскрипции хроматина. Для этих процессов требуется каркасная система, которая будет служить для объединения всех ядерных компонентов: хроматина, ядрышка и ядерной оболочки.

Такой структурой является ядерный белковый матрикс (ЯБМ) — гетерогенный компонент, который выявляется после экстракции из ядра ДНК, РНК и всех гистонов.

Впервые компоненты ядерного матрикса были выделены в 60—70-х годах XX в. Тогда и был предложен термин «ядерный матрикс» для обозначения остаточных структур ядра (Zbarsky, Georgiev, 1959; Georgiev, Chentsov, 1962; Berezhney, Coffey, 1977). В структурном отношении ЯБМ представлен внутриядерной белковой сетью, остаточными ядрышками и ламиной и имеет большое значение в пространственной организации синтеза ДНК и РНК в интерфазном ядре (Iarovaia, Razin, 1983; Berezhney et al., 1995). Оказалось, что ядерный матрикс млекопитающих содержит около 300 белков, но лишь некоторые из них выделены и охарактеризованы (Mika, Rost, 2005).

Вместе с тем существуют данные о том, что в состав ядерного матрикса входит ряд белков, не только принимающих участие в процессе репликации и транскрипции, но и отвечающих за формирование различных уровней организации ДНК (Grisendi et al., 2005; Yung, 2007).

Компоненты ядерного матрикса в нативной клетке являются лабильными структурами. Поэтому морфологическая выраженность каждого из компонентов ядерного матрикса после его получения зависит не только от условий его выделения, но также и от функциональных особенностей клеток (He et al., 1990; Nickerson, 2001).

В нашей работе были использованы поликлональные антитела к белкам фибрилларину и B23, локализуемым только в интерфазных ядрышках, а также аутоиммунные антитела к некоторым полипептидам, которые, по нашим предварительным данным, распределены в интерфазном ядре вне ядрышек. Задачей работы было описание локализации исследуемых белков в интерфазных ядрах необработанных клеток и в ядерном белковом матриксе с использованием иммунофлуоресцентного метода.

Материал и методика

Клеточная культура. Объектом исследования служили клетки культуры СПЭВ (почки эмбриона свиньи), выращенные на покровных стеклах в среде 199 с 10 % сыворотки крупного рогатого скота в присутствии гентамицина (100 мкг/мл). Клетки культивировали при 37 °С на покровных стеклах в чашках Петри и использовали на второй день после посадки.

В работе были использованы поликлональные антитела к белкам фибрилларину и В23 (Amersham Life Science, США), локализующимся в интерфазных ядрышках. Также использовали неохарактеризованные антитела, полученные из сывороток больных аутоиммунными заболеваниями, такими как красная волчанка и системная склеродермия (Институт ревматологии, Санкт-Петербург), которые были любезно предоставлены О. В. Зацепиной (Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва). В наших предыдущих исследованиях на клетках культуры СПЭВ с помощью Вестерн-блота было показано, что антитела этих аутоиммунных сывороток связываются в ядре с ранее неизвестными белками с мол. массами 27, 38, 40, 50 и 65 кДа (Ченцов и др., 2000; Мурашева, Ченцов 2010).

Для выявления стабилизированного ядерного белкового матрикса из клеток удаляли ДНК, РНК и гистоны по модифицированному методу (Berezney, Coffey, 1977). При этом клетки, растущие на покровных стеклах, обрабатывали пермеабилзирующим раствором (50 мМ ТЭА (триэтанолламин), 5 мМ MgCl₂, 0.1 мМ PMSF (фенилметансульфонилфторид), 1 % Тритона X-100 и 1 мМ CuSO₄, pH 7.6) в течение 20 мин, затем экстрагировали гистоны раствором, содержащим 2 М NaCl, 5 мМ ЭДТА и 20 мМ ТЭА, (pH 7.6), в течение 20 мин. ДНК и РНК удаляли с помощью ДНКазы I и РНКазы А (50 мМ ТЭА, 5 мМ MgCl₂, 0.1 мМ PMSF, 100 мкг/мл ДНКазы I, 100 мкг/мл РНКазы А и 1 мМ CuSO₄) в течение 20 мин при 37 °С. После такой обработки клетки промывали раствором, содержащим 20 мМ ТЭА и 1 мМ MgCl₂ (pH 7.6), и для иммунофлуоресцентного выявления белков фиксировали 20 мин холодным метанолом (-20 °С).

Имунофлуоресцентное окрашивание. Как исходные клетки, так и клетки после экстракции ДНК, РНК и гистонов отмывали 30 мин раствором PBS, содержащим 0.1 % Tween 20 и 1 % бычьего сывороточного альбумина (BSA). Для иммунохимического анализа клетки обрабатывали первыми антителами (одной из аутоиммунных сывороток или антителами к фибрилларину и В23), разведенными в соотношении 1 : 50 раствором PBS, содержащим 0.1 % Tween 20 и 1 % бычьего сывороточного альбумина, в течение 40 мин при 37 °С. Затем клетки промывали этим же раствором 3 раза по 5 мин. В качестве вторых антител использовали кроличьи антитела к иммуноглобулинам человека, конъюгированные с флуоресцентным красителем флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ). Вторые антитела использовали в разведении 1 : 100 при 37 °С в течение 30 мин. В качестве отрицательного контроля в каждом опыте использовали окрашивание клеток только с помощью вторых антител. Для выявления ДНК препараты окрашивали флуорохромом DAPI (4, 6-диамидино-2-фенилиндол) в концентрации 1 мкг/мл по стандартной методике. Затем препараты промывали и заключали в заливочную среду Moviol. Препараты

просматривали и фотографировали в люминесцентном микроскопе Zeiss Axiovert 200M, используя объектив с увеличением 100×1.25.

В работе использовали следующие реактивы: среда 199, раствор Хенкса и сыворотка крупного рогатого скота (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов, Россия); гентамицин (Хемофарм, Югославия); Moviol 488 (Calbiochem, США); PBS, Тритон X-100, Tween 20, ТЭА, PMSF, ЭДТА, BSA, DAPI, метанол, ДНКазы I и РНКазы А (Sigma, США); антитела к В23 и фибрилларину (Amersham Life Science, США); кроличьи антитела к иммуноглобулинам человека, конъюгированные с ФИТЦ (Amersham Life Science, США).

Результаты

Интерфазные ядра необработанных клеток. Флуорохром DAPI в интерфазных ядрах клеток культуры СПЭВ диффузно окрашивает все ядро, в котором встречаются небольшие сильно флуоресцирующие глыбки хроматина. Интенсивная флуоресценция наблюдается на периферии ядрышек в районах околядрышкового хроматина, в то время как сами тела ядрышек не окрашиваются (рис. 1—7, а).

С помощью антител к фибрилларину в интерфазных ядрах выявляются равномерно окрашенные ядрышки, а в кариоплазме клеток флуоресценции не наблюдается (рис. 1, б).

В ядрах интерфазных клеток с помощью антител к белку В23 также выявляются равномерно окрашенные ядрышки (рис. 2, б).

При использовании антител к белку с мол. массой 27 кДа на фоне неравномерно окрашенной кариоплазмы выявляется интенсивная флуоресценция в зоне околядрышкового хроматина (рис. 3, б).

При окрашивании ядер с помощью антител к белку с мол. массой 38 кДа на фоне диффузно флуоресцирующей кариоплазмы выявляются большое количество ярких мелких гранул, а также интенсивная флуоресценция на периферии ядрышка в зоне околядрышкового хроматина (рис. 4, б).

Применение антител к белкам с мол. массой 40 кДа позволяет выявить в кариоплазме небольшие округлые светящиеся гранулы, а также значительные скопления флуоресцирующего материала вокруг ядрышек в зоне околядрышкового хроматина (рис. 5, б).

При использовании антител к белку с мол. массой 50 кДа в ядре обнаружены небольшие флуоресцирующие скопления, интенсивная флуоресценция наблюдается в зоне околядрышкового хроматина (рис. 6, б).

При окрашивании ядер с помощью антител к белку с мол. массой 65 кДа в ядре выявляются скопления флуоресцирующего материала. Интенсивная флуоресценция обнаруживается также в зоне околядрышкового хроматина (рис. 7, б).

Таким образом, в необработанных интерфазных клетках исследуемые аутоиммунные антитела к белкам с мол. массами 27, 38, 40, 50 и 65 кДа избирательно связываются с зоной околядрышкового хроматина, не окрашивая основную часть ядрышка в отличие от антител к белкам фибрилларину и В23. Вместе с тем антитела к белкам с мол. массами 40, 50 и 65 кДа в виде небольших скоплений выявляются и в кариоплазме клеток.

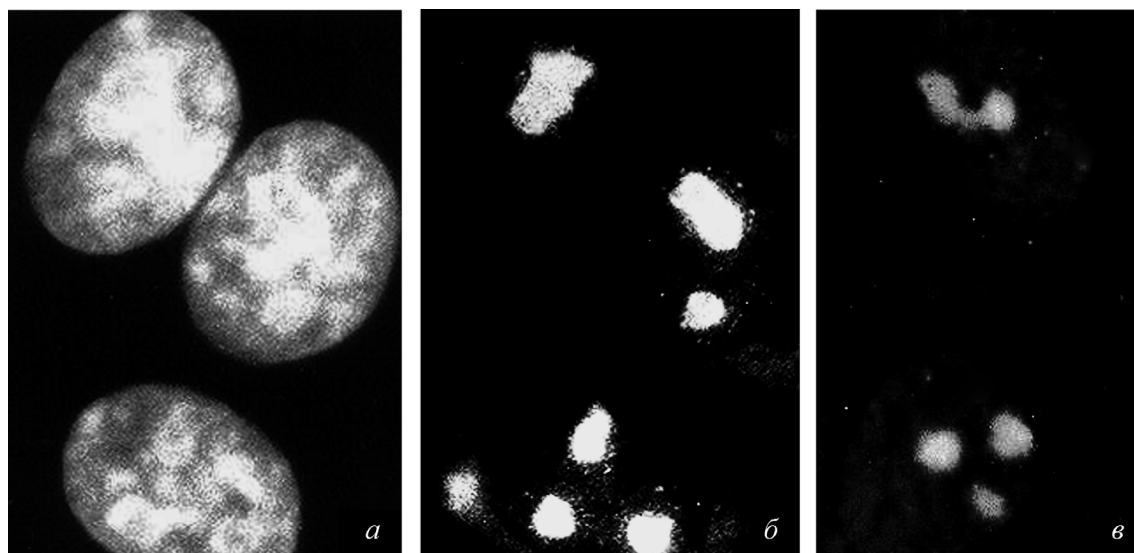


Рис. 1. Локализация антител к фибрилларину в интерфазных клетках культуры СПЭВ.

a, б — необработанные клетки: *a* — окраска DAPI, *б* — окраска с помощью антител к фибрилларину; *в* — окраска ядерного белкового матрикса с помощью антител к фибрилларину. Об. 100×.

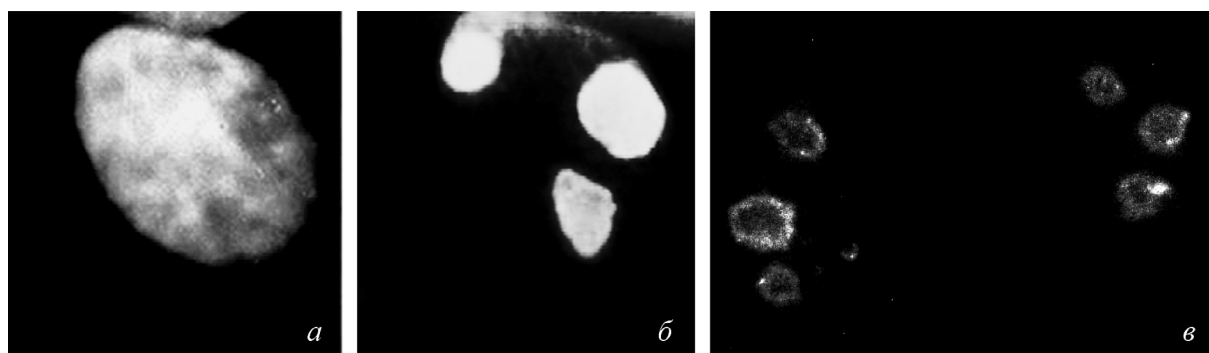


Рис. 2. Локализация антител к белку B23 в интерфазных клетках культуры СПЭВ.

a, б — необработанные клетки: *a* — окраска DAPI, *б* — окраска с помощью антител к белку B23; *в* — окраска ядерного белкового матрикса с помощью антител к белку B23. Об. 100×.

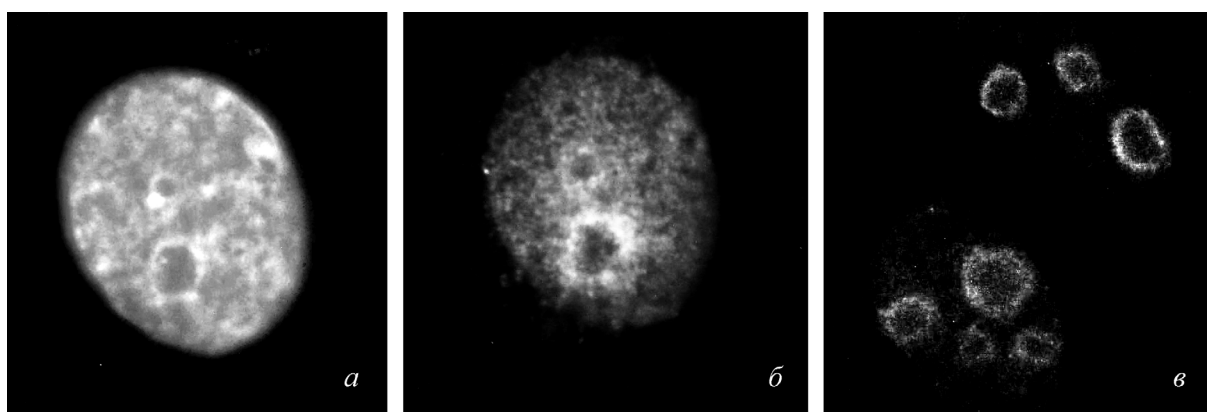


Рис. 3. Локализация антител к белку ядерного матрикса с мол. массой 27 кДа в интерфазных клетках культуры СПЭВ.

a, б — необработанные клетки: *a* — окраска DAPI, *б* — окраска с помощью антител к белку с мол. массой 27 кДа; *в* — окраска ядерного белкового матрикса с помощью антител к белку с мол. массой 27 кДа. Об. 100×.

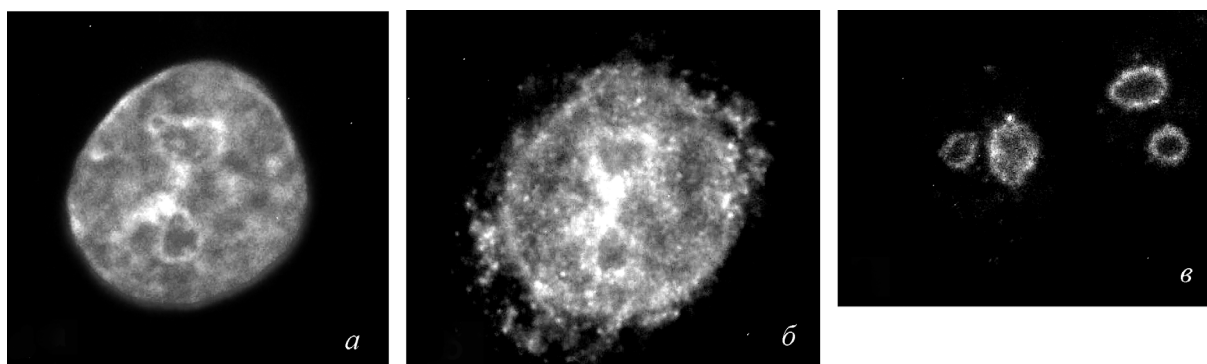


Рис. 4. Локализация антител к белку ядерного матрикса с мол. массой 38 кДа в интерфазных клетках культуры СПЭВ. *a, б* — необработанные клетки: *a* — окраска DAPI, *б* — окраска с помощью антител к белку с мол. массой 38 кДа; *в* — окраска ядерного белкового матрикса с помощью антител к белку с мол. массой 38 кДа. Об. 100×.

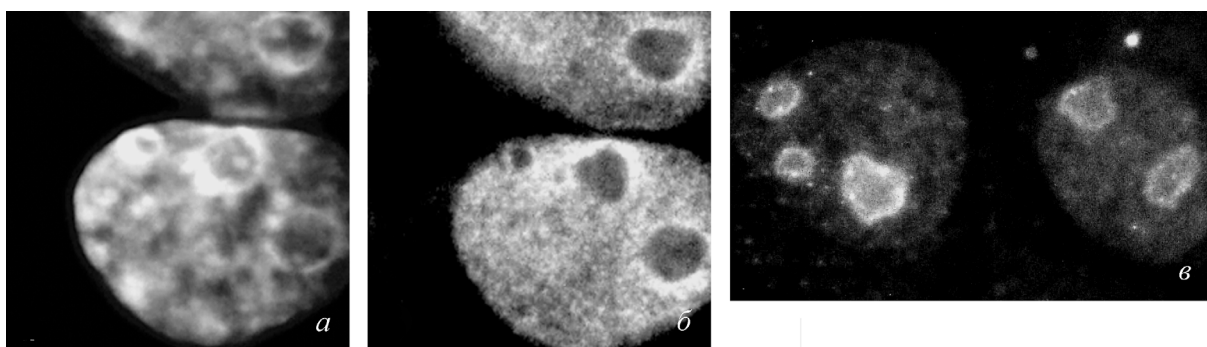


Рис. 5. Локализация антител к белку ядерного матрикса с мол. массой 40 кДа в интерфазных клетках культуры СПЭВ. *a, б* — необработанные клетки: *a* — окраска DAPI, *б* — окраска с помощью антител к белку с мол. массой 40 кДа. *в* — окраска ядерного белкового матрикса с помощью антител к белку с мол. массой 40 кДа. Об. 100×.

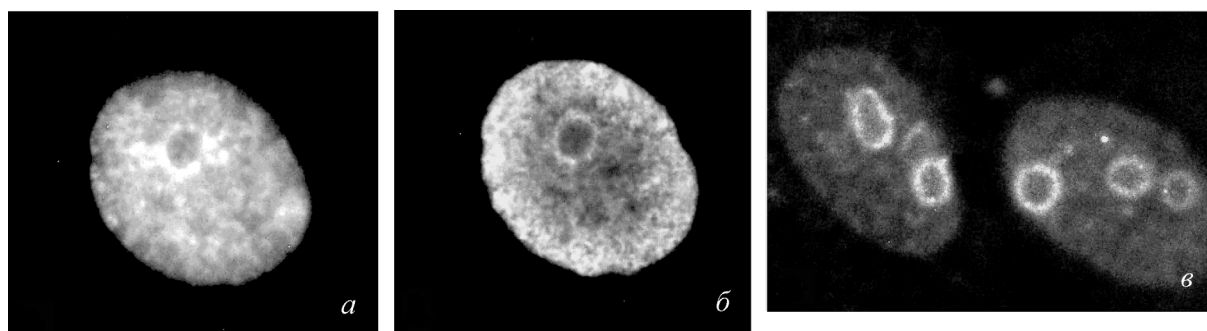


Рис. 6. Локализация антител к белку ядерного матрикса с мол. массой 50 кДа в интерфазных клетках культуры СПЭВ. *a, б* — необработанные клетки: *a* — окраска DAPI, *б* — окраска с помощью антител к белку с мол. массой 50 кДа. *в* — окраска ядерного белкового матрикса с помощью антител к белку с мол. массой 50 кДа. Об. 100×.

Важно выяснить, являются ли белки, выявляемые с помощью использованных антител, компонентами ядерного белкового матрикса и в состав каких его структур (внутриядерная белковая сеть, остаточные ядрышки или ламина) они входят.

Препараты ядерного белкового матрикса. После обработки клеток растворами 2 М NaCl, ДНКазы I и РНКазы А и окрашивания их флуорохромом DAPI окраска компонентов хроматина интерфазных ядер пол-

ностью отсутствовала, что говорит о полном удалении из ядер ДНК.

При использовании антител к фибрилларину в ЯБМ равномерно окрашиваются остаточные ядрышки (рис. 1, *в*).

При окрашивании ЯБМ с помощью антител к белку В23 окрашивается периферия остаточного ядрышка в виде ярко флуоресцирующего ободка (рис. 2, *в*).

При использовании антител к белкам с мол. массами 27 и 38 кДа в ЯБМ выявляется лишь периферия остаточ-

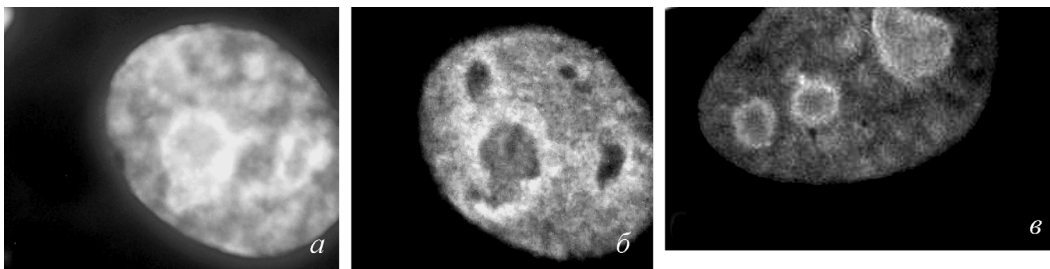


Рис. 7. Локализация антител к белку ядерного матрикса с мол. массой 65 кДа в интерфазных клетках культуры СПЭВ. *а, б* — необработанные клетки: *а* — окраска DAPI, *б* — окраска с помощью антител к белку с мол. массой 65 кДа. *в* — окраска ядерного белкового матрикса с помощью антител к белку с мол. массой 65 кДа. Об. 100×.

ных ядрышек в виде ярко флуоресцирующего ободка (рис. 3, 4, *в*).

Антитела к белкам с мол. массой 40, 50 и 65 кДа выявляются в ЯБМ в виде скоплений флуоресцирующего материала и флуоресцирующего ободка на периферии остаточных ядрышек (рис. 5—7, *в*).

Обсуждение

Известно, что ядрышковый белок фибрилларин связан с транскрипцией рибосомных РНК и, по данным литературы, локализуется в ядрышках интактных интерфазных клеток, как и другой обязательный компонент ядрышка, белок нуклеофозмин, или B23, который участвует в процессинге рибосомных РНК (Мухарьямова и Зацепина, 1993; Martin et al., 2007).

В настоящей работе на интактных интерфазных клетках СПЭВ с помощью поликлональных антител к белкам фибрилларину и B23 мы показали, что оба эти белка равномерно распределяются по всему ядрышку. Наши результаты согласуются с данными Мухарьямовой и Зацепиной (1993).

В последнее время в биологических исследованиях начали использовать методы мечения белков в живых клетках. На культурах клеток HeLa-M (карцинома шейки матки) и 3Т3 (мышинные фибробласты) для флуоресцентного мечения белков ядрышек в живых клетках был использован метод проникающих через мембрану пептидов (Martin et al., 2007). В этой работе авторы поместили флуорохромом белки B23 и фибрилларин и показали, что оба белка локализуются в ядрышке. При этом B23 окрашивал периферическую зону ядрышка, т. е. зону околядрышкового хроматина, а фибрилларин располагался по всему ядрышку в виде крупных скоплений флуоресцирующего материала.

Последние технические разработки, в том числе развитие атомно-силовой микроскопии (АСМ), создали возможности для более детальных исследований строения ядра, в том числе структуры ядерного матрикса. При исследовании с помощью АСМ ядерного матрикса в клетках культуры HeLa было показано, что он состоит из плотно переплетенных фибрилл и представляет собой структуру с отдельными отсеками для свободной диффузии молекул в ядре (Hirano et al., 2008).

Одним из наименее изученных компонентов ядерного матрикса является остаточное ядрышко — плотная структура, повторяющая по своей форме ядрышко.

В своих работах Франке с соавторами (Franke et al., 1981) для получения компонентов ядерного матрикса об-

рабатывали ядра, выделенные из ооцитов *Xenopus laevis*, буферами с различным содержанием бивалентных катионов, в частности Mg^{2+} , и получали кортикальные структуры ядрышек. По их мнению, остаточные ядрышки ооцитов *X. laevis* состоят из плотно уложенных фибрилл — белковых филаментов ядрышкового скелета.

В литературе существуют похожие работы, в которых остаточные ядрышки изучали с помощью электронного микроскопа и показали, что они выглядят как сеть тонких фибрилл. Эти структуры, выделенные из разных типов клеток, таких как ВНК—21 (почка новорожденного хомяка), клеток печени мыши и клеток культуры HeLa, схожи по строению (Chen et al., 1999).

В настоящее время с помощью АСМ можно наблюдать фибриллы ядрышкового скелета, которые, переплетаясь, создают структуру, похожую на губку с отдельными ячейками, в которых в ядрышке могут свободно проходить синтетические процессы (Hirano et al., 2008). Утверждается также, что остаточные ядрышки в клетках HeLa являются устойчивой структурой к действию растворов с высоким и низким содержанием солей, а также нуклеаз.

Как мы видим, остаточное ядрышко — реально существующая каркасная система ядрышка, плотная структура, состоящая из множества белков и схожая у различных типов клеток.

Определение в остаточных ядрышках белков фибрилларина и нуклеофозмина (B23) в нашей работе показало их разную локализацию: белок B23 локализован преимущественно на периферии остаточного ядрышка, там, где до экстракции ДНК находился околядрышковый хроматин, а белок фибрилларин равномерно распределен по всему остаточному ядрышку. Сходная локализация фибрилларина в остаточных ядрышках описана с помощью метода иммунофлуоресцентной микроскопии и в других работах (Ochs, Smetana, 1991; Hirano et al., 2008). Известно также (Chen et al., 1999), что в состав белков остаточных ядрышек входит 6—7 полипептидов. Одним из основных белковых компонентов ядрышкового скелета является фибрилларин, который равномерно распределяется по остаточному ядрышку.

По данным литературы, присутствие B23 в ядрышке связано не только с созреванием рРНК, но и со многими другими регуляторными процессами. Так, B23 играет важную роль в регуляции клеточного ответа при активации различных онкогенных факторов, поскольку он связывается с белками P53 и ARF (Itahana, 2003; Lindström, Zhang, 2006), непосредственно участвует в регуляции патогенеза (Grisendi et al., 2005; Grisendi et al., 2006), необходим для нормального развития клеток в эмбрио-

нальном периоде (Naoe et al., 2006; Yung, 2007), а также играет важную роль в сборке функционирующего комплекса кинетохора (Chun et al., 2011). Сейчас в литературе B23 называют многофункциональным сигнальным белком, локализуемым в ядрышке (Gjerset, 2006; Yung, 2007).

В то время как функции ядрышковых белков вызывают интерес большого числа исследователей, неядрышковые белки ЯБМ изучены мало (Earnshaw, Bernat, 1991; Dundr et al., 1997). Обнаружено, что эти белки имеют главным образом периферическое или диффузное распределение в интерфазных ядрах (Zbarsky, Georgiev, 1959; Chaly et al., 1984; Cai, Zhai, 1994). Известно также, что мол. масса этих белков может варьировать от 25 до 280 кДа (Berezney, Coffey, 1977; Van Hooser et al., 2005), что говорит об их большом разнообразии.

Из наших результатов следует, что неядрышковые белки с мол. массами 27, 38, 40, 50 и 65 кДа в необработанных клетках заполняют все ядро в виде небольших скоплений или гранул, но преимущественно локализованы на периферии интерфазных ядрышек в зоне околядрышкового хроматина. После удаления ДНК, РНК и гистонов белки с мол. массами 27 и 38 кДа в ядерном матриксе локализируются только на периферии остаточных ядрышек, там, где до экстракции ДНК находился околядрышковый хроматин. Этот факт может свидетельствовать о том, что исследуемые белки с мол. массами 27 и 38 кДа в нативном ядре связаны с РНК и ДНК и удаляются при их экстракции. Таким образом, можно предположить, что белки с мол. массами 27 и 38 кДа, как и белок B23, участвуют в регуляторных процессах, протекающих в ядре, таких как репликация ДНК, транскрипция и процессинг РНК. Белки же с мол. массами 40, 50 и 65 кДа после удаления ДНК, РНК и гистонов не только содержатся в большом количестве на периферии остаточных ядрышек, но и образуют многочисленные небольшие скопления в карิโอплазме клеток, т. е., видимо, входят в состав внутренней белковой сети ядерного матрикса. Эти данные подтверждают мнение других авторов (Franke et al., 1981; Nigano et al., 2008) о том, что белковый матрикс состоит из переплетенных белковых филаментов, которые образуют структуру для распределения молекул в ядре. Вместе с тем остается неясным, являются эти белки только каркасными структурами и образуют ячейки сети ядерного белкового матрикса или они также участвуют в регуляторных процессах, протекающих в ядре.

Следует отметить, что все исследуемые белки — ядрышковый B23 и неядрышковые белки с мол. массами 27, 38, 40, 50 и 65 кДа — локализируются в периферической зоне остаточных ядрышек ядерного матрикса, где до экстракции находился околядрышковый хроматин.

Вместе с тем район околядрышкового хроматина считают местом, где в норме в виде гетерохроматина сосредоточены «молчащие» гены, которые активируются при различных воздействиях на клетки (Gjerset, 2006; Grisendi et al., 2006). Некоторые авторы прямо называют слой компактного хроматина, находящегося на периферии ядрышек, перинуклеарным гетерохроматином (Maо et al., 2011). Наличие гетерохроматинных компонентов в районах околядрышкового хроматина показала еще Прокофьева-Бельговская (1986).

Таким образом, можно сделать заключение о том, что белки ядерного матрикса с мол. массами 27, 38, 40, 50 и 65 кДа, а также белок B23 входят в состав околядрыш-

кового хроматина, который может являться особым хромосомным гетерохроматиновым доменом, связанным не только с синтезом рибосомных РНК.

Список литературы

- Мурашева М. И., Ченцов Ю. С. 2010. Белки ядрышкового матрикса с мол. массами 50 и 38 кДа переносятся в составе периферического хромосомного материала. Цитология. 52 (9) : 760—769. (Murashova M. I., Chentsov Yu. S. 2010. The nuclear matrix proteins (mol. mass 38 and 50 kDa) are transported by chromosomes in mitosis. Tsitologiya. 52 (9) : 760—769.)
- Мухарьямова К. Ш., Зацепина О. В. 1993. Структурные и иммуноцитохимические особенности ядрышек, формирующихся в условиях пространственного разобщения ядрышкообразующих хромосом. Цитология. 35 (5) : 3—9. (Mukhar'yamova K. Sh., Zatsypina O. V. 1993. The structural and immunocytochemical characteristics of nucleoli formed under conditions of the 3-dimensional separation of nucleolar organizer chromosomes. Tsitologiya. 35 (5) : 3—9.)
- Прокофьева-Бельговская А. А. 1986. Гетерохроматические районы хромосом. М.: Наука. 430 с. (Prokofyeva-Bel'govskaya A. A. Heterochromatic regions of chromosomes. M.: Nauka. 430 p.)
- Ченцов Ю. С., Бураков В. В., Косых М. И. 1999. Перенос белков ядерного матрикса в составе периферического материала митотических хромосом. Биол. мембраны. 16 (6) : 647—656. (Chentsov Yu. S., Burakov V. V., Kosykh M. I. 2000. Nuclear matrix proteins are carried within peripheral material of mitotic chromosomes. Membr. Cell Biol. 13 (6) : 799—810.)
- Berezney R., Coffey D. S. 1977. Nuclear matrix: isolation and characterization of a structure from rat liver nuclei. J. Cell Biol. 73 : 616—637.
- Berezney R., Mortillaro M. J., Ma H., Wei X., Samarabandu J. 1995. The nuclear matrix: a structural for genomic function. Int. Rev. Cytol. 162 : 1—65.
- Cai S.-T., Zhai Z.-H. 1994. Behaviour of 280 kD nuclear matrix protein in mitotic HeLa cells. Chin. Sci. Bull. 39 : 1656—1658.
- Chaly N., Bladon T., Setterfield G., Little J. E., Kaplan J. G., Brown D. L. 1984. Changes in distribution of nuclear matrix antigens during the mitotic cell cycle. J. Cell Biol. 99 : 661—671.
- Chen J., Shen Y., Jiao R., Zhai Z. 1999. Composition and structure of nucleolar skeleton (nucleolar matrix): actin and fibrillar are two main protein components of nucleolar skeleton. Sci. China C. Life Sci. 42 : 34—42.
- Chun Y., Park B., Koh W., Lee S., Cheon Y., Kim R., Che L., Lee S. 2011. New centromeric component CENP-W is an RNA-associated nuclear matrix protein that interacts with nucleophosmin/B23 protein. J. Biol. Chem. 286 : 42 758—42 769.
- Dundr M., Meier U. T., Lewis N., Rekoeh D., Hammar-skjold M. L., Olson M. O. 1997. A class of noribosomal nuclear components is located in chromosomal periphery and in nucleolus-derived foci during anaphase and telophase. Chromosoma. 105 : 407—417.
- Earnshaw W. C., Bernat R. L. 1991. Chromosomal passenger: towards an integrated view of mitosis. Chromosoma. 100 : 139—146.
- Franke W. W., Kleinschmidt J. A., Spring H., Krohne G., Grund C., Trendelenburg M. F., Stoehr M., Scheer U. 1981. A nucleolar skeleton of protein filaments demonstrated in amplified nucleoli of *Xenopus laevis*. J. Cell Biol. 90 : 289—299.
- Georgiev G. P., Chentsov Y. S. 1962. The structural organization of nucleolochromosomal ribonucleoproteins. Exp. Cell Res. 27 : 570—572.
- Gjerset R. A. 2006. DNA damage, p14ARF, nucleophosmin (NPM/B23), and cancer. J. Mol. Histol. 37 : 239—251.
- Grisendi S., Bernardi R., Rossi M., Cheng K., Khandker L., Manova K., Pandolfi P. P. 2005. Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. Nature. 437 : 147—153.
- Grisendi S., Mecucci C., Falini B., Pandolfi P. P. 2006. Oncogenic role of nucleophosmin/B23. Nat. Rev. Cancer. 6 : 493—505.

- He D., Nickerson J., Penman S. 1990. Core filaments of the nuclear matrix. *J. Cell Biol.* 110 : 569—580.
- Hirano Y., Takahashi H., Kumeta M., Hizume K., Hirai Y., Otsuka S., Yoshimura S. H., Takeyasu K. 2008. Nuclear architecture and chromatin dynamics revealed by atomic force microscopy in combination with biochemistry and cell biology. *Pflug. Arch.* 56 : 139—153.
- Iarovaia O. V., Razin S. V. 1983. Two types of attachment points of DNA to the nuclear skeleton in Ehrlich ascites carcinoma cells. *Mol. Biol.* 17 : 303—313.
- Itahana K., Bhat K. P., Jin A., Itahana Y., Hawke D., Kobayashi R., Zhang Y. 2003. Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Mol. Cell.* 12 : 1151—1164.
- Lindström M. S., Zhang Y. 2006. B23 and ARF: friends or foes. *Cell Biochem. Biophys.* 46 : 79—90.
- Mao Y. S., Zhang B., Spector D. L. 2011. Biogenesis and function of nuclear bodies. *Trends Genet.* 27 : 295—306.
- Martin R. M., Tunnemann G., Leonhardt H., Cardoso M. C. 2007. Nucleolar marker for living cells. *Histochem. Cell Biol.* 127 : 243—251.
- Mika S., Rost B. 2005. NMPdb: database of nuclear matrix proteins. *Nucleic Acids Res.* 33 : 160—163.
- Naoe T., Suzuki T., Kiyoi H., Urano T. 2006. Nucleophosmin: a versatile molecule associated with hematological malignancies. *Cancer Sci.* 97 : 963—969.
- Nickerson J. 2001. Experimental observations of a nuclear matrix. *J. Cell Sci.* 114 : 463—474.
- Ochs R. L., Smetana K. 1991. Detection of fibrillarin in nucleolar remnants and nucleolar matrix. *Exp. Cell Res.* 197 : 183—190.
- Van Hooser A. A., Yuh P., Heald R. 2005. The perichromosomal layer. *Chromosoma.* 114 : 377—388.
- Yung B. Y. 2007. Nucleophosmin and cancer. *Chang Gung Med. J.* 4 : 285—293.
- Zbarsky Y. B., Georgiev G. P. 1959. Cytological characteristic of protein and nucleoprotein of cell nuclei. *Biochim. biophys. acta.* 32 : 301—302.

Поступила 6 VI 2014

IMMUNOCHEMICAL STUDY OF NUCLEAR MATRIX PROTEINS LOCALIZATION IN THE STRUCTURE OF PERINUCLEOLAR CHROMATIN

M. I. Murasheva,¹ Yu. S. Chentsov

Biology Department of M. V. Lomonosov Moscow State University;
¹ e-mail: marinak-m@mail.ru, yuchentsov@mail.ru

Immunofluorescence labeling of proteins with molecular mass of 27, 38, 40, 50 and 65 kDa obtained from serum of patients with autoimmune disease demonstrated different patterns (small clusters or granules) in interphase nuclei of pig kidney cells. It was remarkable that there was no staining inside the nucleoli, but the proteins immunoreactivity was detected around them in the regions of perinucleolar chromatin. Moreover, expression of nucleolar proteins, such as fibrillarin and B23, was found only in nucleoli. After extraction of DNA, PNA and histones, the proteins with molecular mass 27 and 38 kDa were found in the periphery of residual nucleoli, and proteins with molecular mass 40, 50 and 65 kDa had similar localization and were also present in karyoplasm of cells as small clusters. According to our data, nucleolar protein, fibrillarin, was distributed regularly throughout the whole volume of residual nucleoli. At the same time, B23 protein was revealed only at their periphery, where perinucleolar chromatin had localized before treatment. Thus, it has been revealed that the proteins of nuclear matrix with molecular mass 27, 38, 40, 50 and 65 kDa, as well as nucleolar protein B23 are the parts of perinucleolar chromatin, which could be considered as special chromosomal domain associated with the functioning of the nucleolus.

Key words: nucleus, nucleolus, chromatin, nuclear protein matrix, residual nucleolus, immunocytochemistry.