

## ЦИТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕАКЦИИ ЯДРЫШКОВОЙ РНК И РНК-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ НА ДЕЙСТВИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В КЛЕТКАХ HeLa

© А. А. Миронова,<sup>1, 2</sup> Н. В. Барыкина,<sup>1, 3</sup> О. В. Зацепина<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup> Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва,

<sup>2</sup> Факультет биоинженерии и биоинформатики

Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова

и <sup>3</sup> Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П. К. Анохина РАМН, Москва;

\* электронный адрес: [zatsepina\\_olga@mail.ru](mailto:zatsepina_olga@mail.ru)

Ядрышко — одна из наиболее пластичных органелл клетки, функциональное и структурное состояние которой изменяется в ответ на многие стрессовые воздействия. Однако сведения о состоянии ядрышка при окислительном стрессе остаются весьма ограниченными. В настоящей работе мы изучили локализацию ядрышковой РНК и двух РНК-связывающих ядрышковых белков: фибрилларина — раннего фактора процессинга рРНК — и нуклеофозмина/B23 — фактора сборки рибосом при действии на клетки HeLa 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> до 4 ч включительно. Мы показали, что в используемых условиях H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> не вызывает клеточной гибели, но ингибирует транскрипцию рДНК, уменьшает общее содержание РНК в клетках и 18S рРНК в ядрышках и приводит к перераспределению фибрилларина и нуклеофозмина в ядрах. На сегодняшний день сходные изменения в локализации фибрилларина описаны только после действия на клетки млекопитающих HgCl<sub>2</sub>. Изменения в расположении нуклеофозмина, наблюдаемые при окислительном стрессе, проявляются также при ингибировании транскрипции рДНК и ранних стадий процессинга рРНК. В целом результаты работы показывают, что реакция ядрышек опухолевых клеток человека HeLa в ответ на окислительный стресс отчетливо проявляется на цитологическом уровне.

Ключевые слова: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, FISH, нуклеофозмин, окислительный стресс, пиронин Y, рРНК, фибрилларин, ядрышко.

Принятые сокращения: рРНК — рибосомная РНК, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> — пероксид водорода, HgCl<sub>2</sub> — хлорид ртути (II), АФК — активные формы кислорода, PY — пиронин Y, 5-FU — 5-флуороуридин, ДАФИ — 4,6-диамино 2-фенилиндол, ФСБ — фосфатно-солевой буфер, ВнТС1 — первый внутренний транскрибируемый спейсер, КЛСМ — конфокальная лазерная сканирующая микроскопия.

Ядрышко — это самый крупный (до 5 мкм) структурный домен ядер эукариотических клеток, основной функцией которого является биогенез рибосом. У млекопитающих и человека одним из удивительных свойств ядрышек является высокая пластичность, которая проявляется в разнообразии их размеров и морфологии в разных типах клеток, распаде и сборке при клеточном делении (Zharskaya, Zatsepina, 2007; Hernandez-Verdun, 2011), а также в реакции на многие внешние стрессовые воздействия.

Известно, что нарушение гомеостаза клеток сопровождается подавлением синтеза рРНК и рибосом (Lam et al., 2005; Sirri et al., 2008; Boulon et al., 2010; Shiue et al., 2010). Образование рибосом — высокоэнергетический процесс, играющий центральную роль в сложной системе контроля роста и пролиферации клеток. Поэтому подавление транскрипции рибосомных генов (рДНК) — наиболее эффективная стратегия сохранения энергетического статуса клетки, необходимая для поддержания клеточного гомеостаза в условиях стресса. Это позволяет рассматривать ядрышко в качестве центральной фигуры, координирующей

клеточный ответ на стрессовые воздействия (Grummt, 2013).

Большинство реакций клеток млекопитающих на стресс сопровождается нарушением окислительно-восстановительного баланса, что приводит к повышению содержания активных форм кислорода (АФК) внутри клеток (Birben et al., 2012; Sinha et al., 2013; Saeidnia, Abdollahi, 2013). Благодаря высокой реакционной способности АФК могут повреждать белки (Shacter, 2000), нуклеиновые кислоты (Zhao et al., 2007; Kong, Lin, 2010; Poulsen et al., 2012) и липиды (Farmer, Mueller, 2013). Особой «чувствительностью» к окислительному стрессу обладает РНК, в составе которой легко образуются окисленные основания, в первую очередь 8-гидроксигуанозин (Wu, Li, 2008). Высокая степень окисления рРНК может объясняться, в частности, ее ассоциацией с ионами Fe<sup>2+</sup>, способствующими образованию гидроксильных радикалов ( $\cdot$ OH) из H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (реакция Фентона) (Honda et al., 2005; Liu et al., 2012).

Современные исследования роли ядрышка в ответе клетки на окислительный стресс преимущественно сосре-

доточены на молекулярно-биологическом анализе путей передачи стрессовых сигналов к системе опухолевого супрессора p53 и инактивации транскрипции рДНК, которые происходят с участием ядрышковых белков. К таким белкам относятся белки транскрипционного комплекса РНК-полимеразы I (TIF-1A, UBF) (Szymański et al., 2009; Grummt, 2013), нуклеофозмин/B23, нуклеолин/C23, нуклеостемин (Avitabile et al., 2010; Nalabothula et al., 2010; Kar et al., 2011) и рибосомные белки (L11, L5, L23, L7 и L3) (Suzuki et al., 2012). Однако цитологические исследования ответа ядрышка на окислительный стресс остаются весьма ограниченными. В связи с этим в настоящей работе мы проанализировали общие эффекты влияния окислительного стресса на уровень синтеза РНК (с помощью предшественника 5-флуороуридина), содержание РНК (с помощью РНК-связывающего красителя пиронина Y) и локализацию зрелой и незрелой рРНК (методом FISH с использованием зондов к разным участкам пре-рРНК человека) в ядрышках клеток HeLa. В качестве индуктора окислительного стресса был выбран пероксид водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), малый размер которого позволяет свободно проникать сквозь биологические мембраны. Внутри клеток H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> спонтанно преобразуется в реакционно-способный гидроксильный радикал (OH·) — один из основных источников внутриклеточных АФК (Oktyabrsky, Smirnova, 2007; Lisanti et al., 2011). В относительно высоких концентрациях (100 мкМ—10 мМ) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> вызывает «острый» окислительный стресс, который в отличие от «хронического» окислительного стресса проявляется в быстром (в течение минут) ответе клеток на воздействие.

Кроме того, мы проанализировали реакцию двух ядрышковых РНК-связывающих белков — фибрилларина и нуклеофозмина/B23 — на действие H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Фибрилларин — это ядрышковая метилтрансфераза, необходимая для метилирования рРНК и входящая в состав малых ядрышковых РНП (мякРНП). Фибрилларин является основным антигеном, аутоантигена к которому образуются при регулярном воздействии на организмы мыши и человека сублетальных доз хлорида ртути (Pollard et al., 1997; Chen, von Mikecz, 2005; Барыгина и др., 2009). Нуклеофозмин/B23 — основной фактор сборки рибосом, который участвует также в транскрипции рДНК и, кроме того, вовлечен в регуляцию функций опухолевых супрессоров p53 и p14<sup>ARF</sup> (Gjerset, 2006; Lindström, 2011; Marquez-Lona et al., 2012). Фибрилларин и нуклеофозмин/B23 относятся к белкам ядрышка, наиболее «чувствительным» к стрессовым воздействиям. Так, их локализация существенно изменяется при обеднении среды ростовыми факторами (Boulon et al., 2010), повреждении ДНК (Yogev et al., 2008), ингибировании транскрипции (Chen, Jiang, 2004) и ранних стадий процессинга пре-рРНК (Louvet et al., 2005; Zharskaya et al., 2008; Burger et al., 2010). Однако локализация фибрилларина и нуклеофозмина/B23 в условиях окислительного стресса на цитологическом уровне до сих пор не изучалась.

Результаты настоящей работы показали, что основные эффекты острого окислительного стресса в клетках HeLa заключаются в уменьшении содержания РНК и 18S рРНК в ядрышках, ингибировании транскрипции рДНК и частичной миграции фибрилларина и нуклеофозмина/B23 из ядрышка в нуклеоплазму. Характер локализации фибрилларина при воздействии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> напоминает его расположение, описанное при воздействии на клетки HgCl<sub>2</sub>; изменения в локализации нуклеофозмина/B23 на-

блюдаются также при действии агентов, повреждающих ДНК, ингибиторов транскрипции рДНК и ранних стадий процессинга рРНК.

## Материал и методика

**Клеточная культура.** Опухолевые клетки человека HeLa приобретены в Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки выращивали в среде DMEM («ПанЭко», Россия), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота («HyClone», США), L-глутамин (2 мМ), стрептомицин и пенициллин (по 250 ед./мл), при 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>. Клетки выращивали на покровных стеклах и использовали в экспоненциальной фазе роста. Для индукции окислительного стресса клетки инкубировали в среде DMEM, содержащей 1 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, США), от 5 мин до 4 ч при 37 °С. Контрольные клетки инкубировали в тех же условиях в среде DMEM без H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Антитела.** В качестве первичных антител в работе использовали кроличьи поликлональные антитела к фибрилларину (Abcam, США), мышинные моноклональные антитела к нуклеофозмину/B23 (Sigma-Aldrich, США) и мышинные моноклональные антитела к 5-бромдезоксинуридину (5-БрдУ) (Sigma-Aldrich, США). В качестве вторичных антител использовали аффинно-очищенные антитела к иммуноглобулинам мыши, конъюгированные с AlexaFluor(r) 488 (Jackson ImmunoResearch Lab., США) или AlexaFluor(r) 568 (Jackson ImmunoResearch Lab.), и кролика, конъюгированные с AlexaFluor(r) 488 (Jackson ImmunoResearch Lab.). Все антитела разводили в фосфатно-солевом буфере (ФСБ; 0.14 М NaCl, 2.7 мМ KCl, 8.1 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и 1.5 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3) и использовали в концентрациях, рекомендованных фирмами-производителями.

**Иммуоцитохимия.** Для иммуномечения фибрилларина и выявления мест включения 5-флуороуридина (см. ниже) клетки промывали ФСБ и фиксировали 3%-ным параформальдегидом (MP Biomedicals Inc., Франция), приготвленным на ФСБ, 20 мин при комнатной температуре. Клетки пермеабелизовывали 0.5%-ным Тритоном X-100 (MP Biomedicals Inc.) 10 мин на льду. Для выявления нуклеофозмина/B23 клетки фиксировали абсолютным метанолом 10 мин при 4 °С и сразу переносили в ФСБ. Клетки инкубировали с первичными антителами 1 ч при комнатной температуре во влажной камере, промывали ФСБ (3×10 мин) и инкубировали со вторичными антителами 45 мин при комнатной температуре. Перед заключением в Мовиол, содержащий DABCO (1,4-диазобисцикло[2,2,2]октан, Sigma-Aldrich), клетки докрашивали 0.1 мкг/мл ДАФИ (Sigma-Aldrich). Препараты изучали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM510 DuoScanMETA (Carl Zeiss, Германия), оснащенного аргоновым, диодным и твердотельным лазерами с диодной накачкой (diode-pumped solid-state laser, DPSS), используя иммерсионный объектив Plan-Apochromat 63×/ЧА (числовая апертура) 1.40. Изображения обрабатывали, используя пакет программ, прилагаемых к микроскопу, а также программное обеспечение Adobe Photoshop CS (версия 10.0).

**Окрашивание внутриклеточной РНК пиронином Y.** Клетки фиксировали 3%-ным параформальдегидом и обрабатывали детергентом, как описано в

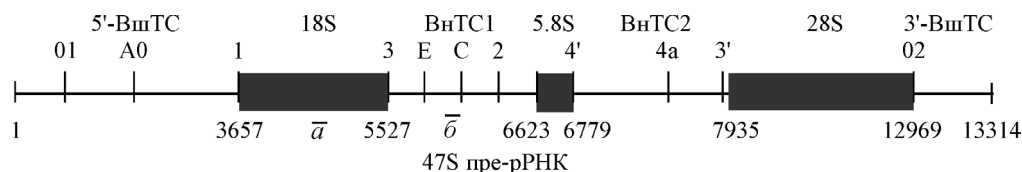


Рис. 1. Схема 47S пре-рРНК человека и положение зондов, использованных для гибридизации *in situ*.

5'ВшТС — 5'-внешний транскрибируемый спейсер, ВнТС1 и ВнТС2 — первый и второй внутренние транскрибируемые спейсеры соответственно; 3'ВшТС — 3'-внешний транскрибируемый спейсер. 18S, 5.8S, 28S — фрагменты пре-рРНК, соответствующие зрелым рРНК. Положение олигонуклеотидных зондов показано горизонтальными черточками внизу схемы: зонд а (+4495/+4524) гибридизуется с 18S рРНК, зонд б (+6127/+6156) — с ВнТС1. 01, A0, 1, 3, E, C, 2, 4', 4a, 3', 02 — известные сайты расщепления в составе пре-рРНК человека. Цифры под схемой обозначают границы 18S, 5.8S и 28S рРНК (н.).

предыдущем разделе. Клетки промывали ФСБ (3×10 мин) и инкубировали с пиронином Y (1 мкг/мл, Sigma-Aldrich; PY) 30 мин при комнатной температуре. Клетки заключали в Мовиол и изучали в микроскоп LSM510 DuoScanMETA, используя иммерсионный объектив Plan-Apochromat 63×/ЧА 1.40. Флуоресценцию PY возбуждали лазером DPSS при длине волны 561 нм и регистрировали с помощью длинноволнового пропускающего фильтра (long pass filter) LP575 (Shapiro, 2003). Изображения обрабатывали, используя пакет программ, прилагаемых к микроскопу, а также программное обеспечение Image J (версия 1.47 для 64-битного Windows), доступное через Интернет-ресурс <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>. Оба подхода приводили к одинаковым результатам.

Импульсное мечение клеток 5-флуороуридином (5-ФУ). Клетки инкубировали в полной культуральной среде, содержащей 2 мМ 5-флуороуридина (5-ФУ, Sigma-Aldrich), 15 мин при 37 °С, несколько раз отмывали средой ДМЕМ и помещали на 20 мин в среду ДМЕМ, содержащую 1 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Контрольные клетки инкубировали то же время в тех же температурных условиях в среде ДМЕМ без предшественника. Клетки фиксировали 3%-ным параформальдегидом, пермеабилizовывали, инкубировали с антителами к 5-БрдУ (антитела связываются также с 5-ФУ), заключали в Мовиол и изучали с помощью микроскопа LSM510 DuoScanMETA, как описано в разделе «Иммуноцитохимия».

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH). В работе использовали олигонуклеотидные зонды, меченные с 5'-конца биотином и специфически выявляющие участки 47S пре-рРНК человека. Зонд а (5'сса тта тtc cta gct gcg gta tcc agg cgg) гибридизуется с участком 18S рРНК, занимающим положение +4495/+4524; зонд б (5'сса тта тtc cta gct gcg gta tcc agg cgg) — с участком первого внутреннего транскрибируемого спейсера (ВнТС1), соответствующим +6127/+6156 (рис. 1). Синтез зондов осуществлен фирмой «Синтол» (Россия); концентрация зондов в стоковых растворах составляла около 2 мкг/мкл.

FISH производили, как подробно описано ранее (Shishova et al., 2011). Клетки фиксировали 4%-ным формалином на ФСБ 30 мин при комнатной температуре. Гибридизационная смесь содержала 50 % деионизованного формамида (Sigma-Aldrich), 10 % декстрансульфата (Loba Chemie, Fischamend, Австрия), 5 % 20×SSC (3 M NaCl и 0.3 M Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>) и 8 нг/мкл олигопробы. Гибридизацию проводили во влажной камере в течение 16 ч при 42 °С. Клетки последовательно промывали 5%-ным формамидом (Panreac, Испания) на 2×SSC (0.3 M NaCl и 0.03 M Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>) при 42 °С (3×10 мин), 2×SSC при 42 °С (10 мин) и 2×SSC (10 мин) при комнатной темпера-

туре. Места гибридизации выявляли с помощью авидина, конъюгированного с родамином (Roche, США) (разведение 1 : 200 в буфере, содержащем 4×SSC (0.06 M NaCl и 0.06 M Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>), 1 ч при комнатной температуре). Клетки 10 мин промывали 4×SSC, а затем 3 раза по 10 мин ФСБ. Для контроля фиксированные клетки обрабатывали 200 мкг/мл РНКазы А на ФСБ 30 мин при 37 °С. Обработка РНКазой А полностью блокировала появление флуоресцентных сигналов (не иллюстрировано).

Использованные реактивы. В работе использовали среду для культивирования ДМЕМ (ПанЭко, Россия); эмбриональную сыворотку крупного рогатого скота (HyClone, США); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, мышинные моноклональные антитела к нуклеофозмину/B23, к 5-бромдезоксисуридину, ДАФИ, пиронин Y, 5-флуороуридин и деионизованный формамид (Sigma-Aldrich, США); кроличьи поликлональные антитела к фибрилларину (Abscam, США); аффинно-очищенные антитела к иммуноглобулинам мыши и кролика, конъюгированные с AlexaFluor® 488 или AlexaFluor® 568 (Jackson ImmunoResearch Lab.); параформальдегид и Тритон X-100 (MP Biomedicals Inc.); декстрансульфат (Loba Chemie, Fischamend, Австрия); формамид (Panreac, Испания); авидин, конъюгированный с родамином (Roche, США).

## Результаты

Общая реакция клеток HeLa на действие H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Окислительный стресс, индуцируемый H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, в зависимости от типа клеток и условий воздействия может вызывать разные эффекты, включая клеточную гибель (Saeidnia, Abdollahi, 2013; Sinha et al., 2013). Для анализа общей реакции клеток HeLa на действие 1 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> живые клетки наблюдали в режиме фазового контраста через разные сроки после начала обработки. Как показано на рис. 2, даже при максимальном сроке воздействия (240 мин) мы не наблюдали признаков гибели клеток (рис. 2, з), а их общий вид практически не отличался от контрольных клеток (рис. 2, а). Можно отметить лишь заметную вакуолизацию цитоплазмы (рис. 2, з), а также уменьшение диаметра ядрышек (в среднем 4 мкм в контроле и 3 мкм после действия H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (рис 3, а). Однако площади ядер при этом практически не изменялись (рис. 3, б).

Выявление РНК с помощью пиронина Y. Пиронин Y (PY) — это катионный краситель, который формирует флуоресцентные комплексы преимущественно с РНК (Darzynkiewicz, Carter, 1988; Andrews et al., 2013). Считается, что интенсивность флуоресценции PY отражает содержание РНК в клетке (Li et al., 2002). Одна-



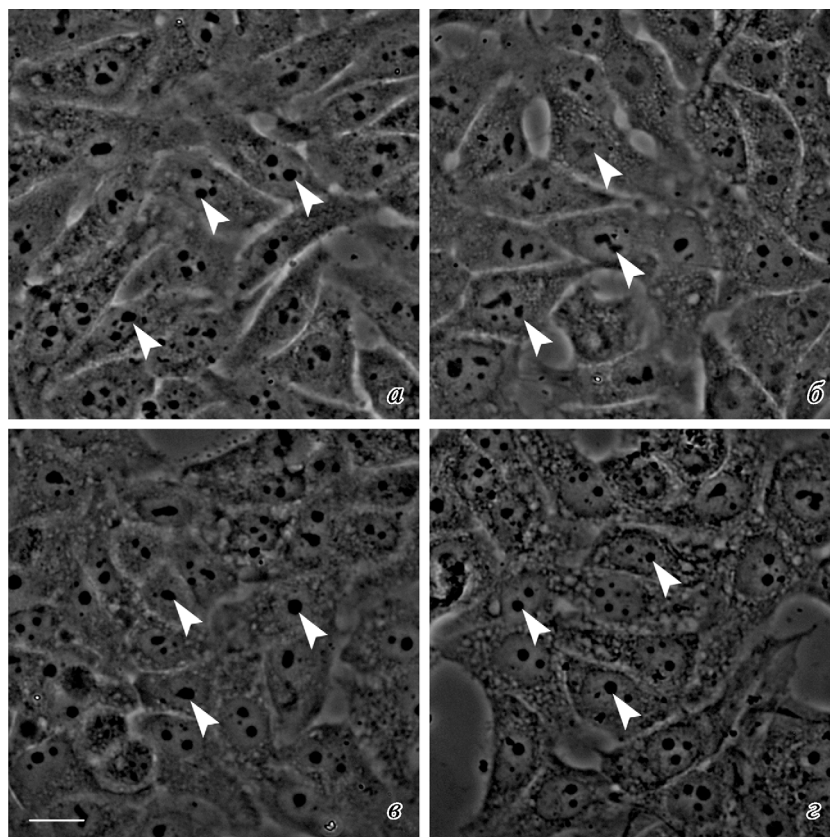


Рис. 2. Фазово-контрастные изображения живых клеток HeLa в контроле (а) и после инкубации с 1 мМ  $H_2O_2$  в течение 30 мин (б), 2 (е) и 4 (з) ч. Ядрышки указаны стрелками. Масштабный отрезок — 10 мкм.

ко подходы для окрашивания клеток РУ и их анализа методами флуоресцентной микроскопии в литературе на сегодняшний день не описаны. В настоящей работе для этих целей мы фиксировали клетки 3%-ным параформальдегидом, обрабатывали Тритоном X-100 (для облегчения доступа красителя), окрашивали 1 мкг/мл РУ, приготовленным на ФСБ, и быстро заключали в Мовиол.

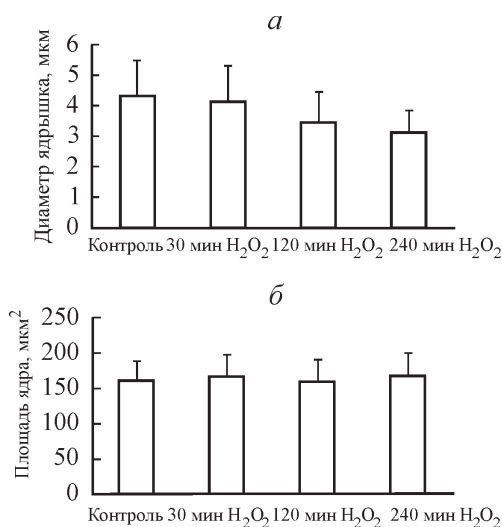


Рис. 3. Средний диаметр ядрышек (мкм; а) и площадь ядер (мкм<sup>2</sup>; б) клеток HeLa в контроле и после воздействия 1 мМ  $H_2O_2$ .

Вертикальные отрезки — стандартные отклонения.

Препараты изучали в конфокальный лазерный микроскоп LSM510, используя для возбуждения флуоресценции лазер с длиной волны 561 нм, а для регистрации флуоресценции — длинноволновый фильтр LP575. Количественную оценку интенсивности флуоресценции производили с помощью пакета программ, прилагаемого к микроскопу LSM510.

Визуальный анализ контрольных клеток (рис. 4, а) и клеток, обработанных  $H_2O_2$ , показывает, что уже через 20 мин после начала действия окислителя (рис. 4, б) наблюдается заметное падение интенсивности флуоресценции РУ в ядрышках по сравнению с контролем. Средняя интенсивность флуоресценции РУ в ядрышках контрольных клеток (40 измерений) составляет  $102 \pm 6$  усл. ед., но уже через 20 мин после воздействия  $H_2O_2$  она уменьшается до  $74 \pm 5$  усл. ед. (51 измерение), т. е. почти в 1.5 раза (рис. 4, б, з). Через 2 ч после начала обработки интенсивность флуоресценции снижается до  $52 \pm 5$  усл. ед. (42 измерения) (рис. 4, д, е). На основании этих наблюдений мы сделали заключение о том, что инкубация клеток с  $H_2O_2$  уменьшает интенсивность флуоресценции РУ, т. е. содержание РНК, в ядрышках.

Влияние  $H_2O_2$  на синтез и локализацию рРНК. Для выяснения причин уменьшения содержания ядрышковой РНК при окислительном стрессе клетки в течение 15 мин инкубировали в культуральной среде, содержащей 5-флуороуридин (5-ФУ). Затем часть клеток обрабатывали 1 мМ  $H_2O_2$  в течение 20 мин, как описано в разделе «Материал и методика»; контрольные клетки инкубировали 20 мин в среде ДМЕМ. Как показано на рис. 5, а, инкубация контрольных клеток с предшеству-

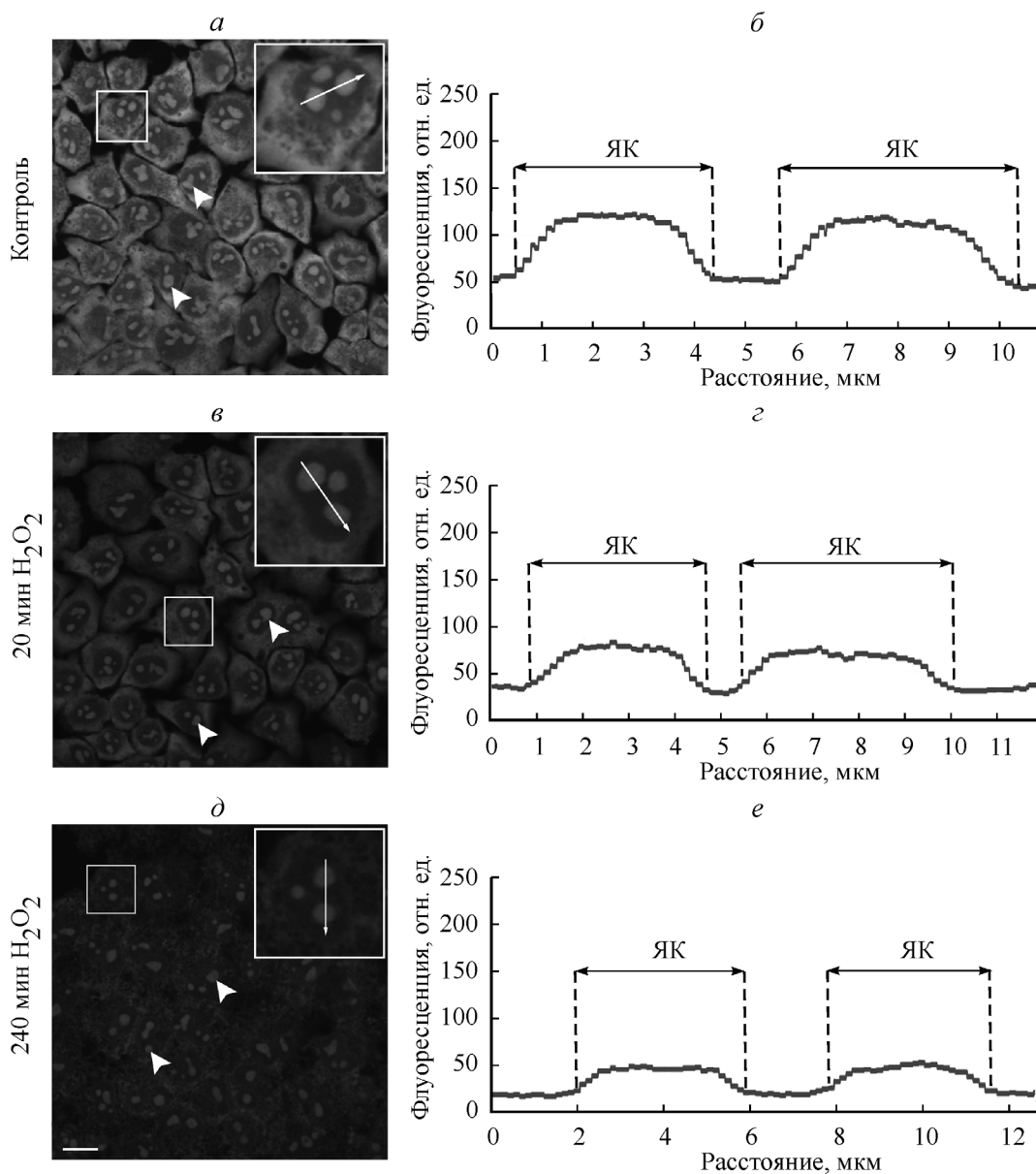


Рис. 4. Выявление РНК в клетках HeLa с помощью пиронина Y (PY) в контроле (а, б) и после обработки 1 мМ  $H_2O_2$  в течение 20 (в, г) и 240 (д, е) мин.

а, в, д — общий вид клеток; ядрышки указаны стрелками. Квадратиками выделены клетки, использованные для построения профилей интенсивности флуоресценции PY вдоль прямой линии (б, г, е), проведенной через ядро и ядрышки. Наконечник стрелки указывает направление сканирования вдоль прямой. б, г, е — профили интенсивности флуоресценции PY. ЯК — ядрышки. Масштабный отрезок — 10 мкм.

ником приводила к отчетливому включению 5-ФУ в ядрышки и ядро. Однако обработка клеток  $H_2O_2$  предотвращала включение 5-ФУ в ядрышки и существенно снижала его включение в нуклеоплазму (рис. 5, б). Принимая во внимание эти наблюдения, можно заключить, что уменьшение интенсивности окрашивания ядрышек PY после действия  $H_2O_2$  может быть связано с ингибированием транскрипции рДНК.

Для анализа влияния  $H_2O_2$  на локализацию незрелой (частично процессированной) и зрелой рРНК контрольные клетки и клетки, инкубированные с  $H_2O_2$  в течение 30 мин, гибридизовали с биотинилированными зондами к ITS1 и 18S рРНК человека соответственно (рис. 1). Как видно на рис. 6, воздействие  $H_2O_2$  приводит к некоторому уменьшению интенсивности сигналов, соответствующих

незрелой рРНК (рис. 6, а, б), и явному уменьшению интенсивности сигналов, соответствующих 18S рРНК (рис. 6, в, г) в ядрышках. На основании этих наблюдений мы сделали вывод о том, что уменьшение общего содержания рРНК в ядрышках при окислительном стрессе происходит не только за счет подавления синтеза пре-рРНК, но и за счет гидролиза окисленной ядрышковой рРНК, синтезированной до начала воздействия окислителя.

Влияние  $H_2O_2$  на локализацию фибрилларина и нуклеофозмина / В 23. В контрольных клетках HeLa фибрилларин выявляется главным образом в ядрышках, где формирует характерные кластеры (рис. 7, а, б). Известно, что эти кластеры располагаются рядом с местами синтеза рРНК (Мухарьямова, Зацепина, 2001; Leary et al., 2004; Turner et al., 2012). В нуклеоплазме практи-

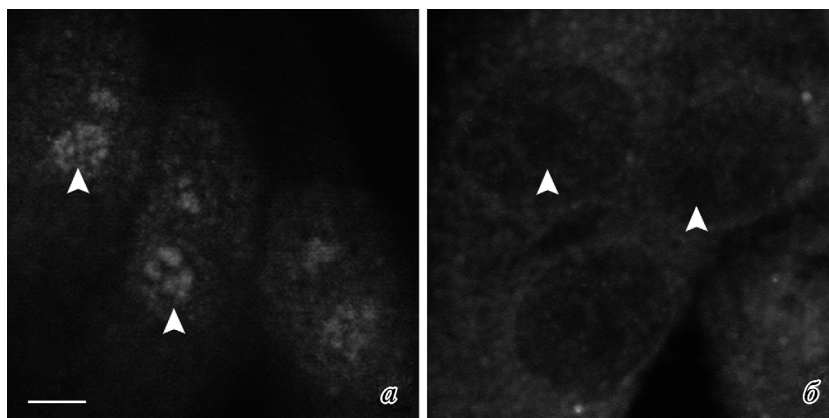


Рис. 5. Анализ транскрипционной активности клеток HeLa с помощью 5-флуороуридина (5-FU) в контроле (а) и после обработки 1 mM  $H_2O_2$  в течение 20 мин (б).

Ядрышки указаны стрелками. Масштабный отрезок — 2 мкм.

чески всех клеток антителами к фибрилларину выявляются также одиночные тельца Кахала (рис. 7, а). Через 20—30 мин после начала воздействия  $H_2O_2$  становится хорошо заметно, что кластеры фибрилларина в ядрышках теряют четкие очертания, начиная как бы расплываться (рис. 7, в, г). При этом тельца Кахала практически не обнаруживаются. Через 1—1.5 ч после обработки  $H_2O_2$  в нуклеоплазме большинства (до 80 %) клеток выявляются многочисленные дискретные фокусы, содержащие фибрилларин, тогда как интенсивность окра-

ски ядрышек уменьшается (рис. 7, д, е). Через 4 ч фибрилларин гомогенно располагается по всему ядру (не иллюстрировано).

В нормальных условиях нуклеофозмин/B23 распределяется в ядрышках практически гомогенно, что особенно хорошо видно при фиксации клеток метанолом (рис. 8, а) (см. также обзоры: Okuwaki, 2008; Lindström, 2011). Воздействие  $H_2O_2$  приводит к существенному ослаблению окрашивания центральной области ядрышек уже через 30 мин после начала обработки (рис. 8, б, в). Через 2 ч

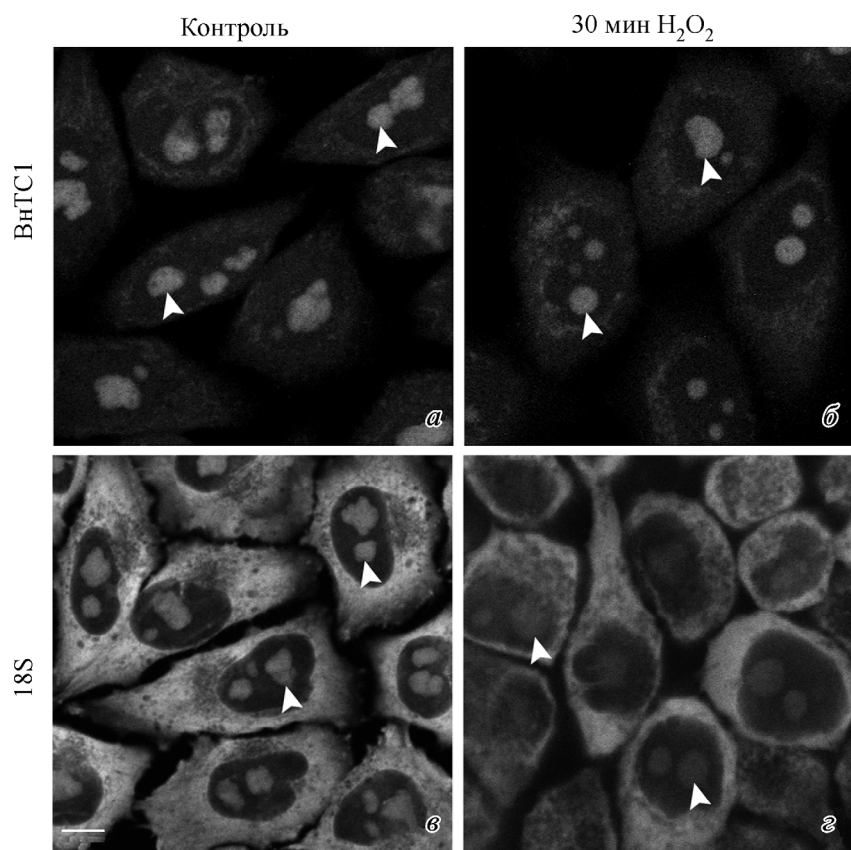


Рис. 6. Флуоресцентная гибридизация *in situ* клеток HeLa с олигонуклеотидными зондами к ВнТС 1 (а, б) и 18S рРНК (в, г) в контроле (а, в) и после обработки 1 mM  $H_2O_2$  в течение 30 мин (б, г).

Ядрышки указаны стрелками. Масштабный отрезок — 5 мкм.



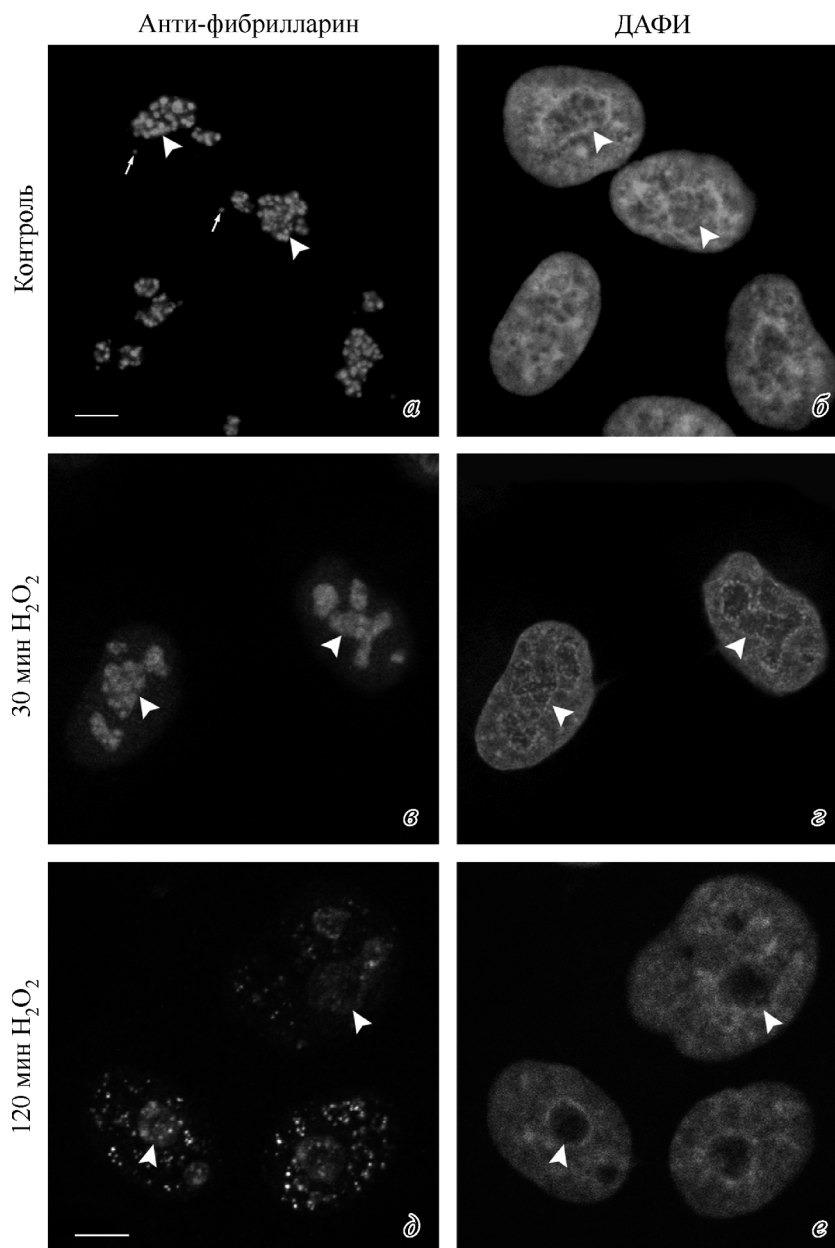


Рис. 7. Иммуноцитохимическая локализация фибрилларина в клетках HeLa в контроле (а, б), через 30 (в, г) и 120 (д, е) мин после начала воздействия 1 мМ  $H_2O_2$ .

Маленькие стрелки — тельца Кахала, большие стрелки — ядрышки. Масштабные отрезки — 5 мкм.

белок выявляется только по периферии ядрышка, тогда как его нуклеоплазматическая локализация становится все более очевидной (рис. 8, з).

### Обсуждение

Эффекты действия  $H_2O_2$  на клетки принято подразделять на острые и хронические. Острые эффекты индуцируются высокими концентрациями пероксида водорода (100 мкМ—10 мМ) путем короткого (от нескольких минут до часов) воздействия, тогда как хронические эффекты вызываются низкими концентрациями  $H_2O_2$  (от нескольких наномолей до 10 мкМ), но продолжительным воздействием (от нескольких часов до нескольких дней).

Ранние эффекты действия  $H_2O_2$  при обоих вариантах обработки связаны с окислением нуклеиновых кислот и посттрансляционными модификациями белков, включая фосфорилирование, глутатионилирование и окисление цистеинов (Paron et al., 2004). Однако при остром окислительном стрессе реакция клеток является более быстрой и, как правило, более однородной, что облегчает ее изучение с использованием различных методов, включая микроскопию.

Как видно на рис. 2, при окислительном стрессе, вызываемом воздействием 1 мкМ  $H_2O_2$ , внешний вид клеток остается сходным на всех сроках воздействия. Существенно, что при этой концентрации пероксида водорода не вызывал гибели клеток в течение всего срока наблюдения, т. е. вплоть до 240 мин (рис. 2, з).

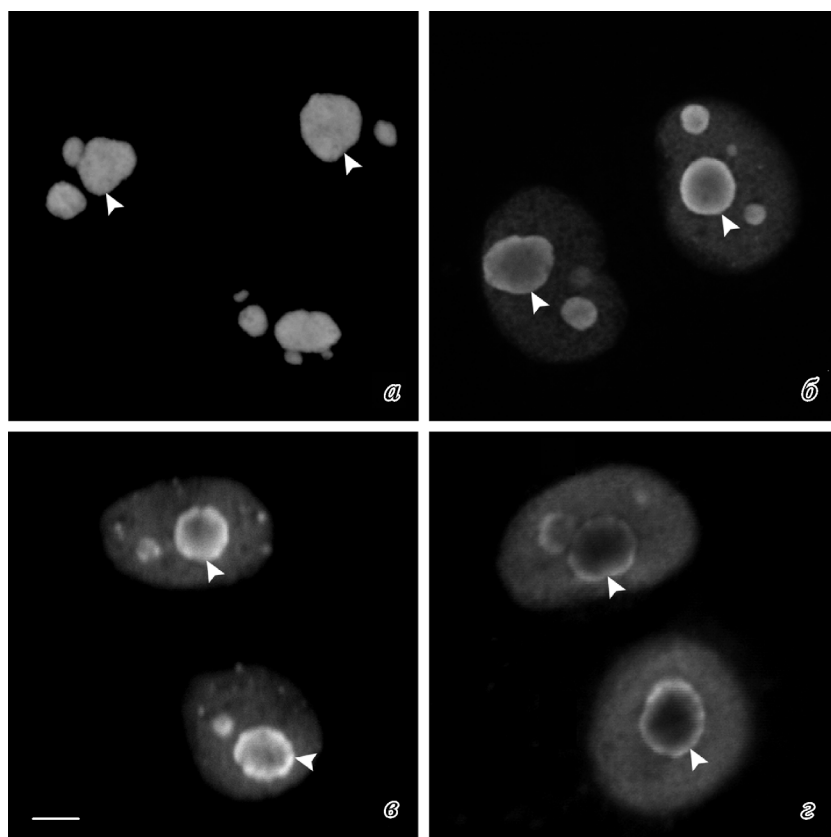


Рис. 8. Иммуноцитохимическая локализация нуклеофозмина/B23 в клетках HeLa в контроле (а), через 45 (б), 120 (в) и 240 (з) мин после начала воздействия 1 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Ядрышки указаны стрелками. Масштабный отрезок — 5 мкм.

Одними из наиболее очевидных эффектов острого воздействия  $\text{H}_2\text{O}_2$  на ядрышки клеток HeLa являлись уменьшение их размеров (рис. 2, а, з; 3, а) и ослабление окрашивания РУ (рис. 4). Эти явления сопровождались ингибированием включения предшественника 5-ФУ в ядрышки (рис. 5) и ослаблением гибридационных сигналов, соответствующих 18S рРНК и непротранскрибированной рРНК (рис. 6).

Из литературных источников известно, что в клетках млекопитающих способность всех видов РНК к окислению экзогенными окислителями (включая пероксид водорода) значительно выше, чем ДНК (Hofer et al., 2005). Более того, РНК подвергается окислительному повреждению значительно сильнее, чем липиды и белки. В клетках HeLa действие высоких доз пероксида водорода (0.2—0.7 мМ) приводит к образованию 8-гидроксилагуанозина в составе РНК (Wu, Li, 2008). РНК, содержащая 8-гидроксилагуанозин, расщепляется специфическими рибонуклеазами, что свидетельствует о существовании в живых организмах механизмов «контроля качества РНК», эффективно удаляющих окисленную РНК (Wu, Li, 2008; Kong, Lin, 2010). Таким образом, резкое падение интенсивности флуоресценции РУ в ядрышках при кратковременной (20—30 мин) обработке клеток HeLa 1 мМ пероксида водорода может быть вызвано не только ингибированием синтеза рРНК, но также окислением и последующим гидролизом уже синтезированной рРНК. Тем не менее мы не можем исключить, что ослабление гибридационных сигналов в ядрышках связано с уменьшением доступности зондов к окисленной рРНК, но не с ее расщеплением. Против этого допущения, однако, говорит

ослабление яркости окрашивания ядрышек РНК-связывающим красителем РУ (рис. 4).

Как известно, клеточный стресс может быть вызван широким спектром воздействий — истощением пула питательных веществ во внешней среде, изменением осмотического давления и температуры, действием ингибиторов различных синтетических процессов (Rieker et al., 2011; Grummt, 2013). В этих условиях наблюдаются частичная или полная инактивация синтеза рибосом (Govoni et al., 1994; Chen, Jiang, 2004; Bensaude, 2011) и транслокация нуклеофозмина/B23 из ядрышка в нуклеоплазму (Yogev et al., 2008; Burger et al., 2010; Yao et al., 2010; Khandelwal et al., 2011; Moore et al., 2013). При действии на клетки HeLa  $\text{H}_2\text{O}_2$  мы также наблюдали «выход» ядрышкового нуклеофозмина/B23 в ядро, сопровождающийся постепенным уменьшением содержания белка в ядрышках (рис. 8). Известно, что транслокация нуклеофозмина/B23 из ядрышка в ядро влияет на многие клеточные функции, включая репарацию ДНК, пролиферацию и жизнеспособность клеток, однако механизм этого явления остается неясным. Одни авторы (Yogev et al., 2008) показали, что перераспределение нуклеофозмина/B23 при ультрафиолетовом облучении индуцируется активацией сигнального пути JNK (с-jun N-концевая протеинкиназа). Однако другие авторы (Khandelwal et al., 2011) связывают перераспределение нуклеофозмина/B23 с изменениями в локализации белка RelA, принадлежащего к семейству стрессактивируемых транскрипционных факторов NF-κB. Третий возможный механизм «выхода» B23 из ядрышка в нуклеоплазму в условиях стресса связан с распадом белковых комплексов, содержащих



нуклеофозмин/B23. Белковые партнеры нуклеофозмина затем подвергаются протеасомной деградации, тогда как нуклеофозмин сохраняется в нуклеоплазме. Начало этих процессов индуцируется подавлением транскрипции РНК-полимеразы I (Moore et al., 2013).

Локализация фибрилларина под действием  $H_2O_2$  начинала изменяться практически одновременно с нуклеофозмином/B23 и также проявлялась в появлении белка в нуклеоплазме (рис. 7). Поскольку по времени изменения в локализации фибрилларина и нуклеофозмина/B23 совпадали с инактивацией синтеза рРНК, можно предположить, что эти события взаимосвязаны. В пользу этого предположения говорит тот факт, что миграция фибрилларина из ядрышка в ядро наблюдается при ингибировании транскрипции рДНК актиномицином D (Louvvet et al., 2005; Boulon et al., 2010). Характерной особенностью изменения локализации фибрилларина, индуцированного  $H_2O_2$ , является появление дискретных фокусов в нуклеоплазме, что сопровождается уменьшением содержания белка в ядрышках (рис. 7, д). На сегодняшний день сходные изменения в локализации фибрилларина описаны только при действии на клетки  $HgCl_2$  — распространенного ксенобиотика, который при регулярном воздействии на организмы млекопитающих индуцирует выработку аутоантител к фибрилларину (Pollard et al., 1997; Chen, von Mikecz, 2005; Барыгина и др., 2009). Появление многочисленных нуклеоплазматических фокусов фибрилларина при действии  $HgCl_2$  и  $H_2O_2$ , скорее всего, не связано с увеличением числа телец Кахала. Несмотря на то что поведение телец Кахала в условиях окислительного стресса на сегодняшний день не анализировалось, известно, что при других вариантах стрессовых воздействий число фибрилларин-позитивных фокусов, соответствующих тельцам Кахала, не увеличивается (Ciocco et al., 2006; Boulon et al., 2010).

С помощью биохимических методов показано, что  $HgCl_2$  вызывает окислительный стресс во многих тканях животных организмов. Это проявляется в повышении содержания АФК, дисбалансе антиоксидантной системы защиты клеток (значительном снижении содержания супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы), окислительном повреждении липидов, белков и нуклеиновых кислот (Woods et al., 1990; Sener et al., 2007; Patnaik et al., 2010; Deng et al., 2012). Представленные нами результаты о сходстве в реакции фибрилларина на действие  $H_2O_2$  и  $HgCl_2$  являются первыми наблюдениями о возможности индукции окислительного стресса  $HgCl_2$ , полученными цитологическими методами анализа.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашения № 14.132.21.1765 и 8484).

### Список литературы

Барыгина В. В., Арефьева А. С., Зацепина О. В. 2009. Роль ртути в процессах жизнедеятельности организма человека и млекопитающих. Экологическая химия. 18 (4) : 189—201. (Barrygina V. V., Aref'eva A. S., Zatssepina O. V. 2010. The role of mercury in the processes of vital activity of the human and mammalian organisms. J. General Chem. 80 (13) : 2694—2703.)  
 Мухарьямова К. Ш., Зацепина О. В. 2001. Визуализация транскрипции рибосомных генов в клетках культуры ткани СПЭВ с помощью бромированного уридинтрифосфата. Цитология. 43 (8) : 792—796. (Mukhar'yamova K. Sh., Zatssepina O. V. 2001. Visualization of ribosomal genes transcription in SPEV culture cells using bromouridine triphosphate. Tsitologiya. 43 (8) : 792—796.)

Andrews L. M., Jones M. R., Digman M. A., Gratton E. 2013. Spectral phasor analysis of Pyronin Y labeled RNA microenvironments in living cells. Biomed. Opt. Express. 4 : 171—177.

Avitabile D., Bailey B., Cottage C. T., Sundararaman B., Joyo A., McGregor M., Gude N., Truffa S., Zarrabi A., Konstantin M., Khan M., Mohsin S., Völkers M., Toko H., Mason M., Cheng Z., Din S., Alvarez R., Jr., Fischer K., Sussman M. A. 2011. Nucleolar stress is an early response to myocardial damage involving nucleolar proteins nucleostemin and nucleophosmin. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 108 : 6145—6150.

Bensaude O. 2011. Inhibiting eukaryotic transcription: which compound to choose? How to evaluate its activity? Transcription. 2 : 103—108.

Birben E., Sahiner U. M., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O. 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. World Allergy Organ J. 5 : 9—19.

Boulon S., Westman B. J., Hutten S., Boisvert F. M., Lamond A. I. 2010. The nucleolus under stress. Mol. Cell. 40 : 216—227.

Burger K., Mühl B., Harasim T., Rohrmoser M., Malamousi A., Orban M., Kellner M., Gruber-Eber A., Kremmer E., Hölzel M., Eick D. 2010. Chemotherapeutic drugs inhibit ribosome biogenesis at various levels. J. Biol. Chem. 285 : 12 416—12 425.

Chen M., Jiang P. 2004. Altered subcellular distribution of nucleolar protein fibrillarin by actinomycin D in HEP-2 cells. Acta Pharmacol. Sin. 25 : 902—906.

Chen M., von Mikecz A. 2005. Xenobiotic-induced recruitment of autoantigens to nuclear proteasomes suggests a role for altered antigen processing in scleroderma. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1051 : 382—389.

Ciocco M. I., Boulon S., Matera A. G., Lamond A. I. 2006. UV-induced fragmentation of Cajal bodies. J. Cell Biol. 175 : 401—413.

Darzynkiewicz Z., Carter S. P. 1988. Photosensitizing effects of the tricyclic heteroaromatic cationic dyes pyronin Y and toluidine blue O (tolonium chloride). Cancer Res. 48 : 1295—1299.

Deng Y., Xu Z., Liu W., Yang H., Xu B., Wei Y. 2012. Effects of lycopene and proanthocyanidins on hepatotoxicity induced by mercuric chloride in rats. Biol. Trace Elem. Res. 146 : 213—223.

Farmer E. E., Mueller M. J. 2013. ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. Annu. Rev. Plant Biol. 64 : 429—450.

Gjerset R. A. 2006. DNA damage, p14ARF, nucleophosmin (NPM/B23), and cancer. J. Mol. Histol. 37 : 239—251.

Govoni M., Farabegoli F., Pession A., Novello F. 1994. Inhibition of topoisomerase II activity and its effect on nucleolar structure and function. Exp. Cell Res. 211 : 36—41.

Grummt I. 2013. The nucleolus-guardian of cellular homeostasis and genome integrity. Chromosoma. 122 : 487—497.

Hernandez-Verdun D. 2011. Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle. Nucleus. 2 : 189—194.

Hofer T., Badouard C., Bajak E., Ravanat J. L., Mattsson A., Cotgreave I. A. 2005. Hydrogen peroxide causes greater oxidation in cellular RNA than in DNA. Biol. Chem. 386 : 333—337.

Honda K., Smith M. A., Zhu X., Baus D., Merrick W. C., Tartakoff A. M., Hattier T., Harris P. L., Siedlak S. L., Fujioka H., Liu Q., Moreira P. I., Miller F. P., Nunomura A., Shimohama S., Perry G. 2005. Ribosomal RNA in Alzheimer disease is oxidized by bound redox-active iron. J. Biol. Chem. 280 : 20 978—20 986.

Kar B., Liu B., Zhou Z., Lam Y. W. 2011. Quantitative nucleolar proteomics reveals nuclear re-organization during stress-induced senescence in mouse fibroblast. BMC Cell Biol. 12 : 33—46.

Khandelwal N., Simpson J., Taylor G., Rafique S., Whitehouse A., Hiscox J., Stark L. A. 2011. Nucleolar NF- $\kappa$ B/RelA mediates apoptosis by causing cytoplasmic relocalization of nucleophosmin. Cell Death Differ. 18 : 1889—1903.

Kong Q., Lin C. L. 2010. Oxidative damage to RNA: mechanisms, consequences, and diseases. Cell Mol. Life Sci. 67 : 1817—1829.

- Lam Y. W., Trinkle-Mulcahy L., Lamond A. I. 2005. The nucleolus. *J. Cell Sci.* 118 : 1335—1337.
- Leary D. J., Terns M. P., Huang S. 2004. Components of U3 snoRNA-containing complexes shuttle between nuclei and the cytoplasm and differentially localize in nucleoli: implications for assembly and function. *Mol. Biol. Cell.* 15 : 281—293.
- Li B., Wu Y., Gao X. M. 2002. Pyronin Y as a fluorescent stain for paraffin sections. *Histochem. J.* 34 : 299—303.
- Lindström M. S. 2011. NPM1/B23 : a multifunctional chaperone in ribosome biogenesis and chromatin remodeling. *Biochem. Res. Int.* 2011 : 195209.
- Lisanti M. P., Martinez-Outschoorn U. E., Lin Z., Pavlides S., Whitaker-Menezes D., Pestell R. G., Howell A., Sotgia F. 2011. Hydrogen peroxide fuels aging, inflammation, cancer metabolism and metastasis: the seed and soil also needs «fertilizer». *Cell Cycle.* 10 : 2440—2449.
- Liu M., Gong X., Alluri R. K., Wu J., Sablo T., Li Z. 2012. Characterization of RNA damage under oxidative stress in *Escherichia coli*. *Biol. Chem.* 393 : 123—132.
- Louvet E., Jume'ra H. R., Le Panse S., Hernandez-Verdun D. 2005. Dynamics and compartmentation of the nucleolar processing machinery. *Exp. Cell Res.* 304 : 457—470.
- Marquez-Lona E. M., Tan Z., Schreiber S. S. 2012. Nucleolar stress characterized by downregulation of nucleophosmin: a novel cause of neuronal degeneration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417 : 514—520.
- Moore H. M., Bai B., Matilainen O., Colis L., Peltonen K., Laiho M. 2013. Proteasome activity influences UV-mediated subnuclear localization changes of NPM. *PLoS ONE.* 8 : e59096.
- Nalabothula N., Indig F. E., Carrier F. 2010. The nucleolus takes control of protein trafficking under cellular stress. *Mol. Cell Pharmacol.* 2 : 203—212.
- Oktyabrsky O. N., Smirnova G. V. 2007. Redox regulation of cellular functions. *Biochemistry (Moscow).* 72 : 132—145.
- Okuwaki M. 2008. The Structure and Functions of NPM1/nucleophosmin/B23, a multifunctional nucleolar acidic protein. *J. Biochem.* 143 : 441—448.
- Paron I., D'Elia A., D'Ambrosio C., Scaloni A., D'Aurizio F., Prescott A., Damante G., Tell G. 2004. A proteomic approach to identify early molecular targets of oxidative stress in human epithelial lens cells. *Biochem. J.* 378 : 929—937.
- Patnaik B. B., Roy A., Agarwal S., Bhattacharya S. 2010. Induction of oxidative stress by non-lethal dose of mercury in rat liver: possible relationships between apoptosis and necrosis. *J. Environ. Biol.* 31 : 413—416.
- Pollard K. M., Lee D. K., Casiano C. A., Blüthner M., Johnston M. M., Tan E. M. 1997. The autoimmunity-inducing xenobiotic mercury interacts with the autoantigen fibrillarin and modifies its molecular and antigenic properties. *J. Immunol.* 158 : 3521—3528.
- Poulsen H. E., Specht E., Broedbaek K., Henriksen T., Ellervik C., Mandrup-Poulsen T., Tonnesen M., Nielsen P. E., Andersen H. U., Weimann A. 2012. RNA modifications by oxidation: a novel disease mechanism? *Free Radic. Biol. Med.* 52 : 1353—1361.
- Rieker C., Engblom D., Kreiner G., Domanskyi A., Schober A., Stotz S., Neumann M., Yuan X., Grummt I., Schutz G., Parlato R. 2011. Nucleolar disruption in dopaminergic neurons leads to oxidative damage and parkinsonism through repression of mammalian target of rapamycin signaling. *J. Neurosci.* 31 : 453—460.
- Saeidnia S., Abdollahi M. 2013. Toxicological and pharmacological concerns on oxidative stress and related diseases. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 273 : 442—455.
- Sener G., Sehirli O., Tozan A., Velioglu-Ovunc A., Gedik N., Omurtag G. Z. 2007. *Ginkgo biloba* extract protects against mercury(II)-induced oxidative tissue damage in rats. *Food Chem. Toxicol.* 45 : 543—550.
- Shacter E. 2000. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab. Rev.* 32 : 307—326.
- Shapiro H. M. 2003. Practical flow cytometry. 4th Edition. Wiley-Liss. 296 p.
- Shishova K. V., Zharskaya O. O., Zatssepina O. V. 2011. The fate of the nucleolus during mitosis: comparative analysis of localization of some forms of pre-rRNA by fluorescent *in situ* hybridization in NIH/3T3 mouse fibroblasts. *Acta Naturae.* 3 : 100—106.
- Shiue C. N., Arabi A., Wright A. P. 2010. Nucleolar organization, growth control and cancer. *Epigenetics.* 5 : 200—205.
- Sinha K., Das J., Pal P. B., Sil P. C. 2013. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Arch. Toxicol.* 87 : 1157—1180.
- Sirri V., Urcuqui-Inchima S., Roussel P., Hernandez-Verdun D. 2008. Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem. Cell Biol.* 129 : 13—31.
- Suzuki A., Kogo R., Kawahara K., Sasaki M., Nishio M., Maehama T., Sasaki T., Mimori K., Mori M. 2012. A new picture of nucleolar stress. *Cancer Sci.* 103 : 632—637.
- Szymański J., Mayer C., Hoffmann-Rohrer U., Kalla C., Grummt I., Weiss M. 2009. Dynamic subcellular partitioning of the nucleolar transcription factor TIF-1A under ribotoxic stress. *Biochim. biophys. acta.* 1793 : 1191—1198.
- Turner A. J., Knox A. A., Watkins N. J. 2012. Nucleolar disruption leads to the spatial separation of key 18S rRNA processing factors. *RNA. Biol.* 9 : 175—186.
- Woods J. S., Calas C. A., Aicher L. D., Robinson B. H., Mailer C. 1990. Stimulation of porphyrinogen oxidation by mercuric ion. I. Evidence of free radical formation in the presence of thiols and hydrogen peroxide. *Mol. Pharmacol.* 38 : 253—260.
- Wu J., Li Z. 2008. Human polynucleotide phosphorylase reduces oxidative RNA damage and protects HeLa cell against oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372 : 288—292.
- Yao Z., Duan S., Hou D., Wang W., Wang G., Liu Y., Wen L., Wu M. 2010. B23 acts as a nucleolar stress sensor and promotes cell survival through its dynamic interaction with hnRNPU and hnRNPA1. *Oncogene.* 29 : 1821—1834.
- Yogev O., Saadon K., Anzi S., Inoue K., Shaulian E. 2008. DNA damage-dependent translocation of B23 and p19 ARF is regulated by the Jun N-terminal kinase pathway. *Cancer Res.* 68 : 1398—1406.
- Zhao H., Tanaka T., Halicka H. D., Traganos F., Zarebski M., Dobrucki J., Darzynkiewicz Z. 2007. Cytometric assessment of DNA damage by exogenous and endogenous oxidants reports aging-related processes. *Cytometry A.* 71 : 905—914.
- Zharskaya O. O., Zatssepina O. V. 2007. The dynamics and mechanisms of nucleolar reorganization during mitosis. *Cell Tissue Biol.* 1 : 277—292.
- Zharskaya O. O., Zatssepina O. V., Barsukova A. S. 2008. Effect of roscovitine, a selective cyclin B-dependent kinase 1 inhibitor, on assembly of the nucleolus in mitosis. *Biochemistry (Moscow).* 73 : 411—419.

## CYTOLOGICAL ANALYSIS OF THE REACTION OF THE NUCLEOLAR RNA AND RNA-BINDING PROTEINS TO OXIDATIVE STRESS IN HeLa CELLS

*A. A. Mironova*<sup>1,2</sup> *N. V. Barykina*<sup>1,3</sup> *O. V. Zatsepina*<sup>1,\*</sup><sup>1</sup> M. M. Shemyakin—Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow,<sup>2</sup> Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, M. V. Lomonosov Moscow State University,and <sup>3</sup> P. K. Anokhin Research Institute of Normal Physiology RAMS, Moscow;

\* e-mail: zatsepina\_olga@mail.ru

The organization and functional activity of the nucleoli of mammalian cells can be modified in response to various stress factors. However, data on the reaction of nucleoli to oxidative stress remain limited. In this paper, we have studied the localization of nucleolar RNAs and two RNA-binding proteins — fibrillarin, a pre-rRNA processing factor, and nucleophosmin/B23, a pre-ribosome assembly factor, in HeLa cells exposed to 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> up to four hours. We have shown that under the conditions used H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> does not induce death, but inhibits rDNA transcription, reduces the total RNA content in the cells and the amount of 18S rRNA in the nucleoli, and causes relocalization of fibrillarin and nucleophosmin/B23 to the nucleoplasm. To date, similar changes in the localization of fibrillarin were described in mammalian cells only after HgCl<sub>2</sub> treatment. Redistribution of nucleophosmin/B23 observed in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells occurred in mammalian cells under inhibition of rDNA transcription and early rRNA processing. Overall, this study shows the high sensitivity of the nucleoli of HeLa cells to acute oxidative stress, which is clearly evident on the cytological level.

Key words: fibrillarin, FISH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nucleolus, nucleophosmin/B23, oxidative stress, pyronin Y, rRNA.