

DOI: 10.31116/tsitol.2018.08.07

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ НУКЛЕОФОСМИНА (B23) И ТРИМЕТИЛИРОВАННОГО ПО ЛИЗИНУ 20 ГИСТОНА H4 (H4K20me3) В КЛЕТКАХ-ЗЕРНАХ КОРЫ МОЗЖЕЧКА КРЫСЫ

© И. М. Плешакова,^{1,2,*} В. В. Гусельникова,¹ Д. А. Суфиева,¹ Д. Э. Коржевский¹

¹ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197376, и

² Кафедра медицинской физики С.-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, 194021;

* электронный адрес: Laylay.96@mail.ru

Целью данного исследования стало изучение взаимного распределения белка нуклеофосмина (B23) и гистона H4K20me3 в клетках-зернах (granule cells) коры мозжечка крысы. Материалом для исследования служили образцы мозжечка половозрелых крыс-самцов линии Вистар (n = 8). С применением методов иммуноцитохимии и конфокальной лазерной микроскопии впервые были изучены особенности распределения белка нуклеофосмина в ядрах клеток-зерен коры мозжечка. В составе ядрышка был обнаружен участок, характеризующийся отсутствием в нем белка B23 и предположительно являющийся фибриллярным центром. Помимо ядрышка нуклеофосмин был выявлен (в меньшем количестве) в нуклеоплазме клеток-зерен. С применением метода конфокальной лазерной микроскопии и трехмерной реконструкции мы продемонстрировали присутствие зон колокализации белка B23 и гистона H4K20me3 в пределах ядрышек и нуклеоплазмы клеток-зерен. Было показано, что гистон H4K20me3 входит в состав околядрышкового гетерохроматина, от которого в глубь ядрышка часто отходят выпячивания разной глубины. Скопления внеядрышкового нуклеофосмина также нередко были колокализованы с глыбками гетерохроматина. Однако присутствовали также и не связанные с глыбками гетерохроматина внеядрышковые скопления нуклеофосмина. Полученные результаты вносят существенное дополнение в имеющиеся представления о структурно-функциональной организации ядра клеток-зерен коры мозжечка.

Ключевые слова: клетки-зерна, мозжечок, нуклеофосмин (белок B23), гистон H4K20me3, ядрышко, гетерохроматин, иммуноцитохимия, конфокальная микроскопия

Принятые сокращения: ГК — гранулярный компонент ядрышка, ИГХ-реакция — иммуногистохимическая реакция, ПФК — плотный фибриллярный компонент ядрышка, ФЦ — фибриллярный центр ядрышка, H4K20me3 — триметилированный по 20-му остатку лизина гистон H4.

Архитектоника клеточного ядра — одна из наиболее востребованных и исследуемых тем цитологии. База накопленных знаний в этой области является основой для развития генетики и имеет широкое практическое применение, например в иммуноцитохимических методах диагностики раковых заболеваний (Worgen et al., 1999). Однако многие фундаментальные вопросы, касающиеся изучения структуры ядра, на сегодняшний день остаются открытыми.

При изучении структур клеточного ядра объектами исследований становились клетки многих тканей, но особый интерес вызывает изучение ядер нейронов, поскольку они являются неделимыми, конечно-дифференцированными клетками и структурные изменения в их ядрах предшествуют многим нейродегенеративным заболеваниям (Woulfe, 2007, 2008). Так, было показано увеличение количества ядерных сфер (белковых агрегатов, состав которых изучается) в ядрах клеток головного мозга человека при болезни Альцгеймера (Kolbe et al., 2016).

Ряд исследователей высказывают мнение о причастности телец Маринеско (убиквитинсодержащих внутриядерных телец) к патогенезу хронических заболеваний нервной системы (Beach et al., 2004; Григорьев и др., 2015; Abbott et al., 2017).

Среди структур головного мозга особый интерес для исследователей представляет кора мозжечка, которая характеризуется высокой упорядоченностью нейронной организации и уникальной ламинарной структурой. На сегодняшний день очевидно, что мозжечок участвует в контроле не только двигательных, но и когнитивных функций, аффективных и поведенческих реакций, динамике эмоционально-личностных и психических изменений (Strick et al., 2009; Klein et al., 2016). Потеря клеток коры мозжечка отмечается при аутизме, хореи Гентингтона, болезни Альцгеймера, множественной системной атрофии и алкоголизме (Sarna, Hawkes, 2003). В большинстве случаев интерес исследователей сконцентрирован на изучении клеток Пуркинье — наиболее крупных, распо-

ложенных в один ряд нейронов, формирующих ганглионарный слой коры мозжечка, в то время как работ, посвященных клеткам-зернам (*granule cells*) гранулярного слоя, немного. При этом клетки-зерна являются наиболее многочисленными нейронами коры мозжечка. На дендритах этих клеток оканчиваются афферентные моховидные волокна, а аксоны клеток-зерен формируют возбуждающие синапсы на дендритах клеток Пуркинье, корзинчатых и звездчатых клеток, а также больших клеток Гольджи (Pora et al., 2014). Тем не менее на сегодняшний день многие вопросы цитохимии и структурно-функциональной организации ядра клеток-зерен коры мозжечка остаются открытыми.

При изучении внутренней архитектуры клеточного ядра обязательным анализируемым компонентом является гетерохроматин, который входит в состав сразу нескольких ядерных субкомпарментов, таких как ламинасоциированные домены, теломерные участки, околождрышковый гетерохроматин и др. Часто при изучении репрессированного хроматина в качестве маркеров используются метилированные формы различных гистонов, такие как H3K27me₂, H3K9me₂, H3K9me₃ и H4K20me₃ (Schotta et al., 2004; Куранова и др., 2014; Fišerová et al., 2017). При этом в литературе отсутствуют данные об особенностях распределения гистона H4K20me₃ в ядрах клеток-зерен коры мозжечка крысы. Другим часто анализируемым ядерным субкомпарментом является ядрышко. Среди различных маркеров ядрышка одним из наиболее широко используемых является белок нуклеофосмин (B23). Данный белок высокоэкспрессирован в нервных клетках и имеет сайт связывания с H4-H3-тетрамером гистонов (Frehlick et al., 2006), что может указывать на существование структурно-функциональной взаимосвязи между белком B23 и гистоном H4K20me₃. Это обуславливает интерес к изучению взаимного расположения данных белков в ядрах клеток-зерен.

Таким образом, целью настоящего исследования стало изучение взаимного распределения гистона H4K20me₃ и нуклеофосмина (белка B23) в клетках-зернах коры мозжечка крысы.

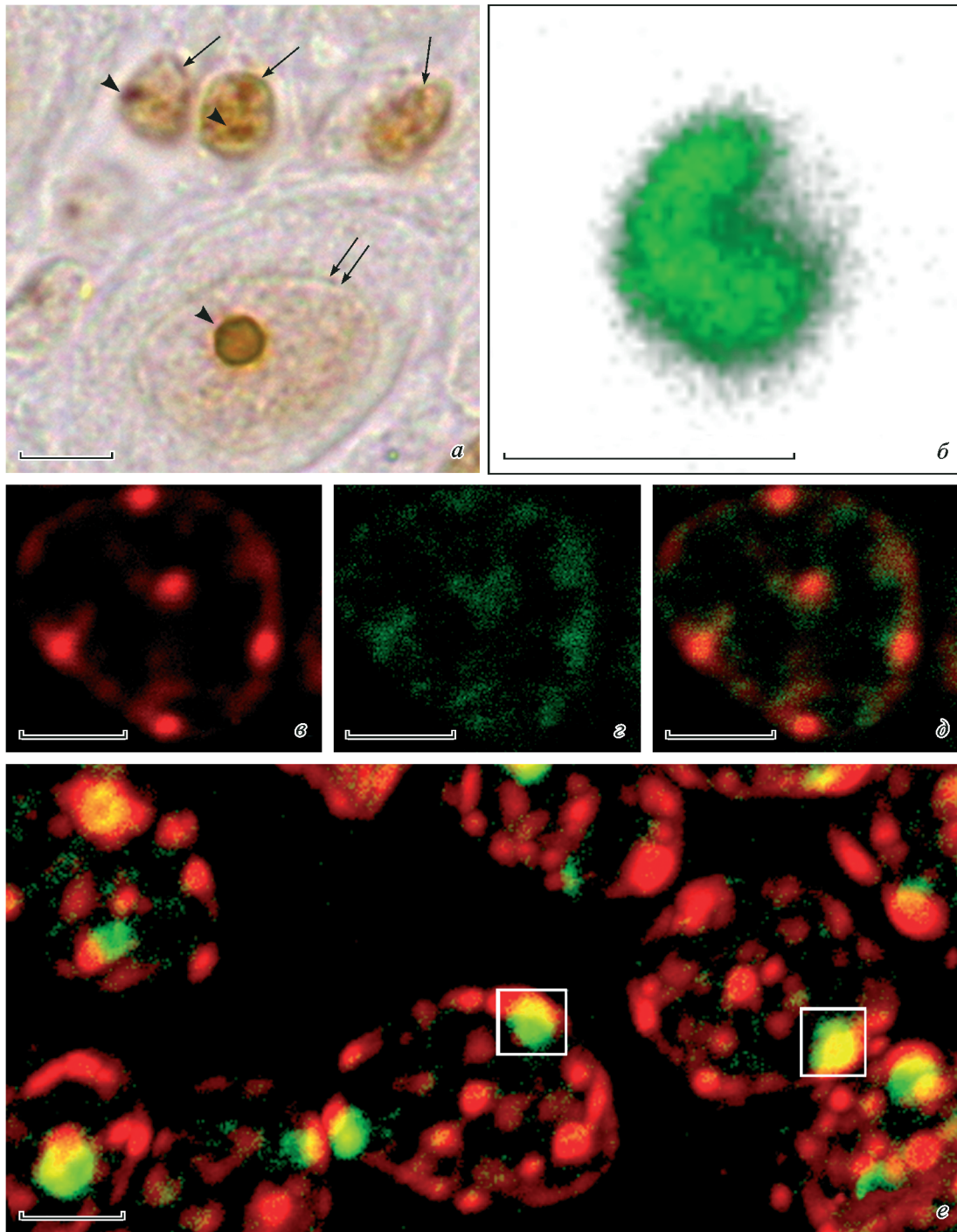
Материал и методика

Материалом для исследования служили образцы мозжечка половозрелых крыс-самцов линии Вистар ($n = 8$). При содержании и умерщвлении животных соблюдались международные правила Хельсинкской декларации о гуманном обращении с животными и «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Материал фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде по описанной ранее методике (Korzhevskii et al., 2015) и после стандартной гистологической проводки заливали в парафин. С парафиновых блоков с помощью ротационного микротомы ROTARY 3003 (PFM medical, Германия) готовили срезы толщиной 5 мкм, которые наклеивали на предметные стекла с адгезивным покрытием (Superfrost Ultra Plus, Thermo Fisher Scientific, Германия). Перед постановкой иммуноцитохимических реакций для улучшения иммунореактивности выявляемых антигенов проводили тепловое демаскирование в модифицированном цитратном буфере, pH 6.1 (S1700, Dako, Дания). Иммуногистохимическое выявление белка нуклеофосмина (B23) осуществляли с помощью мышиных моноклональных антител к

исследуемому белку (клон FC82291, разведение 1 : 200; Sigma-Aldrich, США). В случае использования световой микроскопии в качестве вторичных реагентов применяли MACH 2 Universal HRP Polymer Kit (Bioscience Medical, США). Визуализацию продукта реакции в данном случае проводили с помощью хромогена 3,3'-диаминобензидина (DAB+; Dako, Дания). Для одновременного выявления белка B23 и гистона H4K20me₃ с применением метода конфокальной лазерной микроскопии была поставлена двойная иммуноцитохимическая реакция с использованием моноклональных мышиных антител к белку B23 (Sigma-Aldrich, США) и поликлональных кроличьих антител к гистону H4K20me₃ (Abcam, Великобритания) в конечных разведениях 1 : 300 и 1 : 1500 соответственно. В качестве вторичных реагентов были использованы: моновалентный Fab-фрагмент антимышиного иммуноглобулина ослы, меченный биотином, в разведении 1 : 50 (Jackson ImmunoResearch, США) и стрептавидин, конъюгированный с флуорохромом Cy2, в разведении 1 : 50 (Jackson ImmunoResearch, США); моновалентный Fab-фрагмент кроличьего иммуноглобулина ослы, конъюгированный с флуорохромом Rhodamine Red™-X (RRX), в разведении 1 : 25 (Jackson ImmunoResearch, США). Изучение полученных препаратов и фотосъемку выполняли при помощи светового микроскопа Leica DM750 (Leica, Германия) и конфокального лазерного микроскопа LSM710 (Zeiss, Германия). Для возбуждения флуоресценции RRX применяли твердотельный лазер с длиной волны 561 нм, для возбуждения флуоресценции Cy2 — аргоновый лазер с длиной волны 488 нм. Для анализа полученных изображений использовали компьютерные программы ZEN 2012, LSM Image Browser (Zeiss, Германия), LAS EZ (Leica, Германия); ImageJ (NIH, США). После постановки иммуноцитохимической реакции на белок B23 была проведена количественная оценка размеров ядер и ядрышек клеток-зерен коры мозжечка. Диаметр структур измеряли с использованием компьютерной программы LAS EZ (Leica, Германия). Данные представляли в виде среднего значения \pm ошибка среднего ($X \pm s$) или относительной доли (%). Полученные количественные данные обрабатывали в программе Excel (Microsoft, США). Для отдельных ядрышек был определен коэффициент колокализации B23 и H4K20me₃, который рассчитывался в программном модуле ZEN 2012 с применением функции Co-localization (Weighted colocalization coefficient).

Результаты

Анализ препаратов после постановки иммуногистохимической (ИГХ) реакции на нуклеофосмин показал, что данный белок присутствует в составе ядрышка и нуклеоплазмы клеток-зерен коры мозжечка крысы (см. рисунок, а). В цитоплазме изучаемых клеток нуклеофосмин выявлен не был. В нуклеоплазме клеток-зерен наблюдали умеренную реакцию на данный белок. Он был распределен неравномерно — отмечено наличие скоплений нуклеофосмина, различающихся по размерам и интенсивности продукта ИГХ-реакции, диффузно распределенных по всему ядерному объему (см. рисунок, а). Для ядер клеток-зерен было характерно наличие тонкого контура, что давало возможность судить об их форме и размерах: ядра имели преимущественно овальную форму со средними размерами 5.4 ± 0.5 мкм по длинной оси измерения и 4.3 ± 0.5 мкм по короткой.



Иммуногистохимическое выявление нуклеофосмина (B23) и гистона H4K20me3 в клетках-зернах коры мозжечка головного мозга крысы.

a — фрагмент коры мозжечка крысы. Иммуногистохимическая реакция на нуклеофосмин. *Стрелка* указывает на клетку-зерно, *двойная стрелка* — на клетку Пуркинье, *голова стрелки* — на ядрышко. Объектив PLAN 100×/1.25. *Масштабные отрезки* — 5 мкм. *б* — трехмерная реконструкция ядрышка клетки-зерна. Иммуногистохимическая реакция на нуклеофосмин, визуализация с помощью флуорохрома Cy2. Конфокальная лазерная микроскопия. Величина Z-серии — 5.4 мкм, количество оптических срезов — 19. Реконструкция осуществлена в программном модуле ZEN 2012 (Zeiss, Германия). Объектив Plan-Apochromat 100×/1.4 Oil DIC M27 (масляная иммерсия). *Масштабные отрезки* — 1 мкм. *в–е* — двойная иммуногистохимическая реакция на нуклеофосмин (визуализация с помощью флуорохрома Cy2, *зеленый цвет*) и гистон H4K20me3 (визуализация с помощью флуорохрома RRX, *красный цвет*). Зоны колокализации белка B23 и гистона H4K20me3 окрашены в *желтый цвет*. Конфокальная лазерная микроскопия. Объектив Plan-Apochromat 100×/1.4 Oil DIC M27 (масляная иммерсия). *Масштабные отрезки* — 2 мкм. *в–д* — единственный оптический срез ядра клетки-зерна вне зоны локализации ядрышка. Раздельное (*в, г*) и объединенное (*д*) представление каналов гистона H4K20me3 (*красный, в*) и нуклеофосмина (*зеленый, г*). *е* — ядра клеток-зерен коры мозжечка. Двухмерная проекция 21-го оптического среза с автономной системой выравнивания яркости. Величина Z-серии — 6 мкм. Построение двухмерной проекции осуществлено в программном модуле Projection программы LSM Image Browser (Zeiss, Германия). *Белыми рамками* выделены ядрышки, для которых был рассчитан коэффициент колокализации нуклеофосмина и гистона H4K20me3. Коэффициент колокализации был рассчитан для одиночного оптического среза, на котором ядрышко имело наибольший диаметр. Расчет осуществляли в программном модуле ZEN 2012 с применением функции Co-localization (Weighted colocalization coefficient). Коэффициенты колокализации составили 0.605 и 0.796 для ядрышка в *левой* и *правой* рамках соответственно.

Выявляемые при постановке иммуногистохимической реакции на B23 ядрышки характеризовались четкостью контуров и высокой интенсивностью окраски продукта ИГХ-реакции (см. рисунок, *а*, *головка стрелки*). Как правило, ядрышко было локализовано в ядре ацентрично, часто сильно смещено к периферии ядра, однако встречались и центральнолокализованные ядрышки. В случае использования светового микроскопа, расчетный линейный предел разрешения которого при исследовании продукта ИГХ-реакции на B23 составил 0.311 мкм, было затруднительно судить о точных размерах ядрышек клеток-зерен, а также о наличии или отсутствии в ядрах данных клеток добавочных ядрышек. В связи с этим для оценки данных параметров нами был использован конфокальный лазерный микроскоп, расчетный линейный предел разрешения которого (в случае использования флуорохрома Cy2 для визуализации продукта ИГХ-реакции на B23) составил 0.159 мкм.

Следует отметить, что в ряде случаев при анализе препаратов в поле зрения попадали также клетки Пуркинье коры мозжечка (см. рисунок, *а*, *двойная стрелка*). Было отмечено, что ядрышко данных клеток, как и ядрышко клеток-зерен, характеризуется высокой интенсивностью окрашивания продукта реакции на белок B23 (см. рисунок, *а*, *головка стрелки*). При этом в нуклеоплазме клеток Пуркинье интенсивность ИГХ-реакции на B23 была существенно ниже по сравнению с таковой, наблюдаемой в клетках-зернах.

При изучении распределения белка B23 в клетках-зернах на фотографиях, полученных с помощью конфокального лазерного микроскопа, отчетливо идентифицировались ядрышки, которые являются основным местом локализации нуклеофосмина (см. рисунок, *б*, *е*). Ядрышки данных клеток характеризовались высокой интенсивностью флуоресценции. При этом анализ локализации B23 в ядрышке показал неравномерность в интенсивности и распределении флуоресценции в пределах данного субкомпартамента. Так, в пределах ядрышка клеток-зерен часто выявлялся участок, в котором реакция на B23 отсутствовала. Данный участок имел округлую форму и часто был локализован на периферии, что придавало ядрышку характерную бобовидную форму (см. рисунок, *б*).

Количество ядрышек в ядрах клеток-зерен варьировало. Большинство клеток характеризовалось наличием одного ядрышка (52.7%), однако в ряде случаев в пределах одного ядра было выявлено два (36.1%), реже — три (11.1%) ядрышка. При этом чем меньше ядрышек присутствовало в ядре, тем больший размер они имели. Так, для клеток-зерен с одним ядрышком средний диаметр ядрышка составлял 1.05 ± 0.08 мкм, тогда как для клеток, содержащих два ядрышка, эта величина составила 0.91 ± 0.11 , а для клеток с тремя ядрышками — 0.79 ± 0.09 мкм.

Интенсивность флуоресценции B23 в нуклеоплазме клеток-зерен была в 5 раз ниже по сравнению с флуоресценцией данного белка в ядрышке. Внеядрышковые агрегаты B23 имели неправильную форму без четких границ. При этом можно было выделить два типа скоплений нуклеофосмина в пределах нуклеоплазмы — скопления, локализованные по периферии ядра и прилежащие к внутренней поверхности ядерной оболочки, и диффузно распределенные скопления, лежащие в центральной области ядра (см. рисунок, *з*).

Анализ препаратов после постановки двойной иммунофлуоресцентной реакции на белок B23 и гистон

H4K20me3 позволил изучить распределение скоплений данных белков друг относительно друга в ядрах клеток-зерен (см. рисунок, *в—е*). Было показано, что ядра данных клеток содержат большое количество H4K20me3-иммунопозитивного гетерохроматина (см. рисунок, *в*). Гетерохроматин был выявлен в ядрах клеток-зерен в виде глыбок преимущественно сферической формы, характеризующихся разными размерами и локализацией. Крупные скопления гетерохроматина были обнаружены по периферии ядра, в непосредственной близости от внутренней поверхности ядерной оболочки. В части клеток эти периферические глыбки гетерохроматина лежали плотно друг к другу, соединяясь перемычками и формируя слой периферического гетерохроматина. Агрегаты гетерохроматина присутствовали также в центральной области ядра (см. рисунок, *в*). Количество и размеры этих глыбок варьировали. Нередко такие «внутренние» скопления были связаны с глыбками периферического гетерохроматина.

При анализе взаимного расположения белка B23 и гистона H4K20me3 и при расчете коэффициента колокализации в программном модуле ZEN 2012 с применением функции Co-localization (Weighted colocalization coefficient) было показано, что в ядрах клеток-зерен часто имеет место совпадение флуоресцентных сигналов B23 и H4K20me3 (см. рисунок, *д*, *е*, *желтый цвет*). Так, все выявленные с применением антител к белку B23 ядрышки были ассоциированы с глыбками гетерохроматина (см. рисунок, *е*). Ядрышки, расположенные на периферии ядра, контактировали с глыбками периферического гетерохроматина, в то время как центрально локализованные ядрышки контактировали с «внутренними» глыбками. При этом четко просматривалась зона колокализации флуоресцентных сигналов внутриядрышкового B23 и гистона H4K20me3 (см. рисунок, *е*, *желтый цвет*). Размер зоны колокализации варьировал от небольшого перекрытия на периферии ядрышка и до полной колокализации двух флуоресцентных сигналов в пределах данного субкомпартамента.

Анализ трехмерных реконструкций позволил судить об особенностях пространственного взаимодействия гетерохроматина и ядрышек клеток-зерен. Было отмечено, что околядрышковый гетерохроматин, который прилежит к ядрышку снаружи, в одних клетках представлен одной или несколькими глыбками, в то время как в других клетках ядрышко погружено в «чашу» из гетерохроматина на половину или на две трети своего объема. Вне зависимости от количества околядрышкового гетерохроматина и его локализации для большинства клеток было показано наличие выпячиваний, идущих от околядрышкового гетерохроматина в глубину ядрышка. В одних клетках такие выпячивания лишь слегка заходили в периферическую область ядрышка, в других они проникали в глубину ядрышка, доходя до области отсутствия флуоресценции, которая определяется нами как фибриллярный центр.

Помимо ядрышка зоны колокализации флуоресцентных сигналов были выявлены в нуклеоплазме (см. рисунок, *д*). Некоторые гетерохроматиновые глыбки были обнаружены в местах скопления нуклеофосмина в центральной области ядра. Аналогичная колокализация была обнаружена на периферии ядра. Важно отметить, что наряду с участками колокализации B23 и гистона H4K20me3 в пределах ядер клеток-зерен встречались также отдельные скопления B23, не колокализированные с гистоном H4K20me3, и глобулы гетерохроматина, лежащие вне скоплений B23.

Обсуждение

В рамках представленной работы нами впервые были изучены особенности распределения белка нуклеофосмина в ядрах клеток-зерен коры мозжечка головного мозга крысы. Согласно литературным данным, нуклеофосмин является главным маркером ядрышек и высокоэкспрессирован в нервных клетках (Pfister, D'Mello, 2015), однако особенности распределения данного белка применительно к клеткам-зернам коры мозжечка до настоящего времени изучены не были. В представленной работе мы продемонстрировали присутствие нуклеофосмина как в составе ядрышка, так и в нуклеоплазме клеток-зерен. Полученные нами данные о количестве ядрышек в ядрах клеток-зерен коры мозжечка крыс согласуются с результатами, полученными ранее при анализе данных параметров с применением метода серебрения белков, ассоциированных с ядрышковым организатором (Lafarga et al., 1989).

Ранее при изучении ядер клеток-зерен коры мозжечка крыс с применением метода электронной микроскопии было показано наличие в ядрышках данных клеток расположенного ацентрично крупного фибриллярного центра (ФЦ) (Lafarga et al., 1989). При изучении распределения белка В23 в пределах ядрышек клеток-зерен мы обнаружили, что на периферии ядрышка часто выявляется участок, в котором данный белок отсутствует. Мы полагаем, что этот участок, не содержащий белка В23, соответствует фибриллярному центру. Данное предположение подтверждается имеющимися литературными данными, свидетельствующими о том, что нуклеофосмин присутствует преимущественно в зоне гранулярного компонента ядрышка (ГК), в меньшей степени — в зоне плотного фибриллярного компонента (ПФК) и отсутствует в ФЦ (Feric et al., 2016; Korzhevskii et al., 2017).

Помимо ядрышка нуклеофосмин был обнаружен нами в нуклеоплазме клеток-зерен. Такая локализация может быть объяснена многочисленными внеядрышковыми функциями нуклеофосмина. Так, показано, что будучи полифункциональным белком, В23 вовлечен в регуляцию процессов репликации, транскрипции и репарации ДНК, стабилизацию и сплайсинг иРНК, контроль клеточного цикла, регуляцию апоптоза (Okuwaki et al., 2001; Lindstrom, 2011; Зенит-Журавлева и др., 2012). Кроме того, было отмечено, что нуклеофосмин способен формировать комплексы с белком CTCF (CCCTC-binding factor) и необходим для его нормальной работы (Yusufzai et al., 2004). Фактор транскрипции CTCF считается одним из основных организаторов различных сетей регуляции генов, включая активацию и репрессию транскрипции, образование независимо функционирующих доменов хроматина, регуляцию импринтинга и т. д. Фундаментальные свойства CTCF позволяют ему действовать как фактору транскрипции, инсуляторному белку, а также как компоненту распределенных по геному пограничных элементов, способному привлекать различные факторы, появляющиеся в ответ на разнообразные внешние и внутренние сигналы (Kotova et al., 2014). Было показано, что CTCF аккумулируется на поверхности ядрышка, где, взаимодействуя с нуклеофосмином, выполняет структурную функцию, фиксируя два ядерных субкомпартамента — ядрышко и околядрышковый гетерохроматин — друг относительно друга (Yusufzai et al., 2004). При этом было отмечено наличие CTCF также в нуклеоплазме. Возможно, обнаруженное нами присутствие В23 в нуклеоплазме

клеток-зерен связано в том числе со способностью данного белка формировать функциональный комплекс с CTCF за пределами ядрышка.

Нами не было отмечено присутствие нуклеофосмина в цитоплазме клеток-зерен. Это противоречит данным литературы, согласно которым нуклеофосмин имеет сигнал ядерного экспорта и участвует в транспорте рибосомальных белков из ядра в цитоплазму, что предполагает присутствие В23 в цитоплазме клеток (Lindstrom, 2011; Pfister, D'Mello, 2015). Отсутствие реакции на нуклеофосмин в случае клеток-зерен может быть объяснено тем, что концентрация В23 в цитоплазме данных клеток недостаточна для его выявления методами иммуоцитохимии.

Интересные данные были получены нами при одновременном выявлении в ядрах клеток-зерен нуклеофосмина и гистона H4K20me3, который является маркером репрессированного хроматина (Jørgensen et al., 2013). В данном исследовании при постановке двойной реакции на белок В23 и гистон H4K20me3 мы отметили присутствие зон совпадения флуоресцентных сигналов в ядрышках и нуклеоплазме клеток-зерен, что может свидетельствовать о колокализации изучаемых белков. Ранее Лафарга с соавторами (Lafarga et al., 1989) показали, что в ряде случаев перинуклеолярный гетерохроматин, окружающий ядрышко, формирует выпячивание — хроматиновую ножку (chromatin pedicle), которая проходит через ПФК и касается фибриллярного центра ядрышка. Наблюдаемая нами частичная колокализация ядрышкового нуклеофосмина и гистона H4K20me3 может быть объяснена именно формированием подобного рода выпячивания со стороны перинуклеолярного гетерохроматина в ядрышко. Это подтверждается также тем, что в ряде случаев наблюдаемая нами зона колокализации В23 и H4K20me3 заканчивалась именно на границе с областью предполагаемого ФЦ. Значение обнаруженной нами в некоторых случаях полной колокализации ядрышкового В23 и гистона H4K20me3 остается не до конца понятным.

Скопления внеядрышкового нуклеофосмина также нередко были колокализованы с глыбками гетерохроматина. Возможно, такая колокализация является свидетельством структурно-функционального взаимодействия этих двух белков. В пользу данного предположения свидетельствует тот факт, что нуклеофосмин обладает сайтами связывания с тетрамером гистонов H4-H3, димером гистонов H2A-H2B, а также линкерным гистоном H1. Было показано, что связываясь с гистонами, нуклеофосмин функционирует как шаперон, участвуя в формировании нуклеосомной частицы и нуклеосомы в целом (Okuwaki et al., 2001; Frehlick et al., 2007; Gadad et al., 2011).

Таким образом, в рамках представленной работы нами впервые было проведено исследование распределения белка нуклеофосмина в ядрах клеток-зерен коры мозжечка крысы и изучен характер взаимного расположения нуклеофосмина и гистона H4K20me3. Было показано, что основным местом локализации нуклеофосмина является ядрышко клеток-зерен. При этом в составе ядрышка была обнаружена область, не содержащая белка В23, которая, вероятно, является фибриллярным центром. Было отмечено, что ядрышко всегда ассоциировано с глыбками перинуклеолярного гетерохроматина, содержащего гистон H4K20me3. В большинстве случаев околядрышковый гетерохроматин формирует выпячивание разной глубины внутрь ядрышка. Внеядрышковые скопления В23 в нуклеоплазме также часто были колокализованы с глыбками H4K20me3-содержащего гетерохроматина, однако было

отмечено наличие скоплений внеядрышкового B23, не ассоциированных с гетерохроматином. В целом полученные результаты вносят существенное дополнение в имеющиеся представления о структурно-функциональной организации ядра клеток-зерен коры мозжечка.

Список литературы

- Григорьев И. П., Коржевский Д. Э., Сухорукова Е. Г., Гусельникова В. В., Кирик О. В. 2015. Внутриядерные убиквитин-иммунопозитивные структуры нейронов черного вещества головного мозга человека. Цитология. 57 (11): 780—787. (Grigoriev I. P., Korzhevskii D. E., Sukhorukova E. G., Gusel'nikova V. V., Kirik O. V. 2016. Intranuclear ubiquitin-immunopositive structures in human substantia nigra neurons. Cell Tissue Biol. 10: 29—36.)
- Зенит-Журавлева Е. Г., Полковниченко Е. М., Лушникова А. А., Трещалкина Е. М., Букаева И. А., Райхлин Н. Т. 2012. Нуклеофосмин и нуклеолин: кодирующие гены и экспрессия в различных тканях животных и человека. Молекуляр. мед. 4: 24—31. (Zenit-Zhuravleva E. G., Polkovnichenko E. M., Lushnikova A. A., Treshchalina E. M., Buakaeva I. A., Raikhlin N. T. 2012. Nucleophosmin and nucleolin: encoding genes and expression in various human and animal tissues. Mol. Med. 4: 24—31.)
- Куранова М. Л., Плескач Н. М., Ледащева Т. А., Михельсон В. М., Спивак И. М. 2014. Мозаичные формы атаксии-телеангиэктазии. Цитология. 56 (8): 619—629. (Kuranova M. L., Pleskach N. M., Ledasheva T. A., Mikhelson V. M., Spivak I. M. 2015. Mosaic forms of ataxia telangiectasia. Cell Tissue Biol. 9 (1): 53—63.)
- Abbott R. D., Nelson J. S., Ross G. W., Uyehara-Lock J. H., Tanner C. M., Masaki K. H., Launer L. J., White L. R., Petrovitch H. 2017. Marinesco bodies and substantia nigra neuron density in Parkinson's disease. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 43: 621—630.
- Beach T. G., Walker D. G., Sue L. I., Newell A., Adler C. C., Joyce J. N. 2004. Substantia nigra Marinesco bodies are associated with decreased striatal expression of dopaminergic markers. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 63: 329—337.
- Borgen E., Naume B., Nesland J. M., Kvalheim G., Beiske K., Fodstad Ø., Diel I., Solomayer E.-F., Theocharous P., Coombes R. C., Smith B. M., Wunder E., Marolleau J.-P., Garcia J., Pantel K. 1999. Standardization of the immunocytochemical detection of cancer cells in BM and blood. I. Establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells. Cytotherapy. 1: 377—388.
- Feric M., Vaidya N., Harmon T. S., Mitrea D. M., Zhu L., Richardson T. M., Kriwacki R. W., Pappu R. V., Brangwynne C. P. 2016. Coexisting liquid phases underlie nucleolar subcompartments. Cell. 165: 1686—1697.
- Fišerová J., Efenberková M., Sieger T., Maninová M., Uhlířová J., Hozák P. 2017. Chromatin organization at the nuclear periphery as revealed by image analysis of structured illumination microscopy data. J. Cell Sci. 130: 2066—2077.
- Frehlick L. J., Eirín-López J. M., Ausió J. 2007. New insights into the nucleophosmin/nucleoplasm family of nuclear chaperones. Bioessays. 29: 49—59.
- Gadad S. S., Senapati P., Syed S. H., Rajan R. E., Shandilya J., Swaminathan V., Chatterjee S., Colombo E., Dimitrov S., Pelicci P. G., Ranga U., Kundu T. K. 2011. The multifunctional protein nucleophosmin (NPM1) is a human linker histone H1 chaperone. Biochemistry. 50: 2780—2789.
- Jørgensen S., Schotta G., Sørensen C. S. 2013. Histone H4 lysine 20 methylation: key player in epigenetic regulation of genomic integrity. Nucleic Acids Res. 41: 2797—2806.
- Klein A. P., Ulmer J. L., Quinet S. A., Mathews V., Mark L. P. 2016. Nonmotor functions of the Cerebellum: an introduction. AJNR Amer. J. Neuroradiol. 37: 1005—1009.
- Kolbe K., Bukhari H., Loosse C., Leonhardt G., Glotzbach A., Pawlas M., Hess K., Theiss C., Muller T. 2016. Extensive nuclear sphere generation in the human Alzheimer's brain. Neurobiol. Aging. 48: 103—113.
- Korzhevskii D. E., Gusel'nikova V. V., Kirik O. V., Sukhorukova E. G., Grigoriev I. P. 2017. The spatial organization of the intranuclear structures of human brain dopaminergic neurons. Acta Naturae. 9: 20—27.
- Korzhevskii D. E., Sukhorukova E. G., Kirik O. V., Grigoriev I. P. 2015. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde. Eur. J. Histochem. 59: 233—237.
- Kotova E. S., Akopov S. B., Sverdlov E. D., Nikolaev L. 2014. Transcription factor CTCF and mammalian genome organization. Biopolym. Cell. 30: 260—272.
- Lafarga M., Berciano M. T., Hervas J. P., Villegas J. 1989. Nucleolar organization in granule cell neurons of the rat cerebellum. J. Neurocytol. 18: 19—26.
- Lindström M. S. 2011. NPM1/B23: a multifunctional chaperone in ribosome biogenesis and chromatin remodeling. Biochem. Res. Int. 2011: 195—209.
- Okuwaki M., Matsumoto K., Tsujimoto M., Nagata K. 2001. Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. FEBS Lett. 506: 272—276.
- Pfister J. A., D'Mello S. R. 2015. Insights into the regulation of neuronal viability by nucleophosmin/B23. Exp. Biol. Med. (Maywood). 240: 774—786.
- Popa L. S., Hewitt A. L., Ebner T. J. 2014. The cerebellum for jocks and nerds alike. Front. Syst. Neurosci. 8: 1—13.
- Sarna J. R., Hawkes R. 2003. Patterned Purkinje cell death in the cerebellum. Prog. Neurobiol. 70: 473—507.
- Schotta G., Lachner M., Sarma K., Ebert A., Sengupta R., Reuter G., Reinberg D., Jenuwein T. 2004. A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. Genes Develop. 18: 1251—1262.
- Strick P. L., Dum R. P., Fiez J. A. 2009. Cerebellum and non-motor function. Annu. Rev. Neurosci. 32: 413—434.
- Woulfe J. M. 2007. Abnormalities of the nucleus and nuclear inclusions in neurodegenerative disease: a work in progress. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 33: 2—42.
- Woulfe J. 2008. Nuclear bodies in neurodegenerative disease. Biochim. biophys. acta. 1783: 2195—2206.
- Yusufzai T. M., Tagami H., Nakatani Y., Felsenfeld G. 2004. CTCF tethers an insulator to subnuclear sites, suggesting shared insulator mechanisms across species. Mol. Cell. 13: 291—298.

Поступила 27 IV 2018

THE DISTRIBUTION OF THE NUCLEOPHOSMIN (B23) AND HISTONE H4K20me3
IN THE GRANULE CELLS OF THE RAT CEREBELLAR CORTEX*I. M. Pleshakova,^{1,2,*} V. V. Gusel'nikova,¹ D. A. Sufieva,¹ D. E. Korzhevskii¹*¹ Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, 197376, and² Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University,
Medical Physics Department, St. Petersburg, 194021;

* e-mail: Laylay.96@mail.ru

The investigation of co-distribution of nucleophosmin (B23) and histone H4K20me3 in the rat cerebellar granule cells was the purpose of this study. The cerebellum samples of an adult male Wistar rats (n = 8) were used as the material for the study. The distribution features of the nucleophosmin in cerebellar granule cells were explored using immunocytochemistry and confocal laser microscopy at the first time. It was shown that nucleolus is the main site of nucleophosmin localization. As a part of the nucleolus, a region was found that is characterized by absence of B23 protein in it and is presumably a fibrillar center. In addition to the nucleolus, nucleophosmin was detected (in a smaller amount) in the nucleoplasm of the granule cells. Using the method of confocal laser microscopy and three-dimensional reconstruction, we demonstrated the presence of colocalization zones of the B23 protein and histone H4K20me3 within the nucleolus and nucleoplasm of the granule cells. It was shown that histone H4K20me3 is part of the perinucleolar heterochromatin from which deep protrusions of various depths often extend into the nucleolus. Extranucleolar nucleophosmin clusters were also often colocalized with heterochromatin clumps. However, there were also non-nucleolus clusters of nucleophosmin which were not associated with heterochromatin clumps. The obtained results make a significant addition to the content of the structural and functional organization of the nuclei of the cerebellar granule cells.

Key words: granule cells, cerebellum, nucleophosmin (B23), histone H4K20me3, nucleolus, heterochromatin, immunohistochemistry, confocal microscopy
