

М.А. СОБОЛЬ

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, Киев

ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕННОЙ ГРАВИТАЦИИ НА КОЛИЧЕСТВО И ЛОКАЛИЗАЦИЮ ФИБРИЛЛАРИНА В ЯДРЫШКАХ КОРНЕВОЙ МЕРИСТЕМЫ КРЕСС-САЛАТА



Впервые в условиях измененной гравитации с использованием ультраструктурной иммуоцитохимии с антителами к фибрилларину, а также с использованием трансмиссионной электронной микроскопии локализован фибрилларин — один из важнейших белков процессинга рРНК. По количественному распределению метки антител к фибрилларину в ядрышке в условиях клиностатирования выявлено уменьшение мечения как переходной зоны ФЦ-ПФК, так и плотного фибриллярного компонента по сравнению с контролем. Полученные данные позволяют предположить снижение уровня процессинга рРНК в ядрышках под влиянием измененной гравитации.

© М.А. СОБОЛЬ, 2003

Введение. Фундаментальное открытие гравиточувствительности клеток поставило три основных, тесно взаимосвязанных вопроса [1]:

— как разного типа клетки воспринимают гравитацию?

— каковы механизмы влияния микрогравитации на клетки?

— каковы возможности и механизмы адаптации клеток к этому фактору?

Было показано, что при влиянии микрогравитации происходят существенные перестройки структурной организации и важнейших процессов жизнедеятельности растительных клеток [2]. Характер изменений исследуемых параметров четко указывает на значительные изменения уровня и направленности метаболизма под влиянием микрогравитации, которые отображаются в перестройках структуры клеточных органелл и скорости интегральных процессов роста и развития растительных организмов [3].

Известны данные о структурно-функциональной организации митохондрий, хлоропластов, аппарата Гольджи, эндоплазматического ретикулума в этих условиях [4–8], однако данные о влиянии клиностатирования и реальной микрогравитации на ядрышко весьма ограничены [9, 10].

Ядрышко — это клеточная органелла, где происходит транскрипция рибосомальной ДНК (рДНК), процессинг рибосомальной РНК (рРНК) и созревание рибосомных субъединиц. В результате транскрипции рДНК синтезируется молекула предшественника рибосомальной РНК — 45S пре-рРНК. Во время процессинга рРНК молекула 45S-рРНК специфически расщепляется, в результате чего образуется по одной копии 28S-рРНК, 18S-рРНК и 5,8S-рРНК, которые, собственно, и являются компонентами рибосом. В процессинге молекул пре-рРНК принимают участие многие белки и мРНК: фибрилларин, нуклеолин, GAR1, SSB1, U3, U8, U13, U14, U15, U22, NAP57, которые образуют РНП-комплекс, названный «процессомой», по аналогии со «сплайсосомой», РНП-комплексом, задействованным в сплайсинге пре-мРНК [11]. Фибрилларин (или дрожевой гомолог NOP1) является эволюционно консервативным белком и одним из важнейших белков процессинга пре-рРНК [12–14]. Присутствие гена фибрилларина существенно для жизнеспособности дрожжей [13]. Главными признаками фибрилларина являются домен GAR, обогащенный глицином и диметиларгинином, и последовательность RRM (RNA recognition motif).

Последний элемент имеют некоторые другие ядрышковые белки, например нуклеолин [12, 13, 15, 16]. В ходе созревания рибосомных субъединиц вновь синтезированные транскрипты связываются с рибосомными белками с образованием рибосом [17]. В этой связи исследование функционирования ядрышка на каждом из этапов рибосомного биогенеза в условиях измененной гравитации представляет несомненную важность и значимость для поисков ответа на то, каковы механизмы влияния микрогравитации на клетки. Цель работы состояла в выяснении особенностей процессинга рибосомальной РНК в ядрышках растительных клеток в условиях измененной гравитации.

Материалы и методы. Основным объектом исследования были клетки зоны меристемы главного корня двухсуточных проростков кресс-салата (*Lepidium sativum* L.). Семена кресс-салата в стерильных условиях помещали в питательную среду, содержащую 1%-ный раствор агара в дистиллированной воде. При посеве семена ориентировали зародышевым корнем вниз. Проростки росли в темноте в течение 2 сут. Для выращивания растительных объектов в условиях клинотатирования нами были использованы горизонтальные медленно вращающиеся клинотаты (2 об/мин). Вращение биологического образца на горизонтальном клинотате с соответствующей скоростью частично воспроизводит биологические эффекты микрогравитации, так как обеспечивает непрерывную реориентацию объекта по отношению к гравитационному вектору, что препятствует восприятию растением гравитационного стимула или реализации последующего ответа [18, 19].

Моноклональные антитела к фибрилларину были любезно предоставлены профессором Э.К.Л. Чаном (Центр аутоиммунных заболеваний, Калифорния, США). Реакция этих антител с фибрилларином лука (*Allium cepa* L.) была описана в работе Реймера с соавт. [20]. Для ультраструктурной иммуноцитохимии было использовано разведение 1 : 5 в 2%-ном BSA и 0,05%-ном Tween 20 в PBS. В качестве вторичных антител использовали козью сыворотку против иммуноглобулинов IgG мыши. Вторичные антитела разводили в соотношении 1 : 50 в блокирующем растворе 2%-ного BSA, 0,05%-ного Tween 20 в PBS. Все антитела поставлены фирмой Sigma.

Вторичные антитела были конъюгированы с частицами золота диаметром 10 нм.

Корни кресс-салата фиксировали смесью 4%-ного формальдегида и 0,5%-ного глутаральдегида в фосфатном буфере, pH 7,2 в течение 2 ч при комнатной температуре. Во время промывки в буфере под бинокляром лезвием отделяли меристему корней, которая и представляла собой объект дальнейших исследований. Меристемы дегидратировали в этаноле повышающейся концентрации и инфильтровали в акриловой смоле LRWhite при +4 °C. После окончания инфильтрации меристемы раскладывали по капсулам, заливали чистой смолой LRWhite и выдерживали 23 ч в термощкафу при +61 °C для полимеризации. Ультратонкие срезы толщиной 70–80 нм монтировали на покрытых формваром никелевых сетках.

Ультратонкие срезы меристем, заключенных в LRWhite, промывали в 0,05%-ном растворе Tween 20 в PBS и выдерживали в блокирующем растворе 2%-ного BSA и 0,05%-ного Tween 20 в PBS 30 мин. Срезы инкубировали в первичных антителах к фибрилларину 1 ч, промывали в трех сменах 0,05%-ного раствора Tween 20 в PBS и инкубировали с вторичными антителами 1 ч. Срезы промывали в трех сменах 0,05%-ного раствора Tween 20 в PBS и в трех сменах бидистиллированной воды. Сетки высушивали на фильтровальной бумаге и окрашивали в 2%-ном растворе уранил ацетата 15 мин. Препараты исследовали в трансмиссионном электронном микроскопе Philips 300 при 80 кВ. Плотность мечения над субъядрышковыми компонентами вычисляли, используя программу «QWin Standard» (Leica) для автоматического анализа изображений. Контроль мечения проводили, опуская инкубацию в первичных антителах.

Результаты исследования. В контроле мечение антителами к фибрилларину на ультраструктурном уровне было локализовано в ядрышке. Метка выявлена на периферии фибриллярных центров, т.е. в переходной зоне ФЦ-ПФК, и в плотном фибриллярном компоненте. Гранулярный компонент и ядрышковые вакуоли не содержали частиц золота (рис. 1).

По количественному распределению метки антител к фибрилларину в ядрышке наиболее меченой оказалась переходная зона ФЦ-ПФК — $8,10 \pm 2,35$ гранул золота на 1 мкм^2 . Плотный фибриллярный компонент содержал значительно

меньшее количество метки — $1,56 \pm 0,24$ гранул золота на 1 мкм^2 (рис. 2).

В условиях измененной гравитации метка антител к фибрилларину на ультраструктурном уровне имела исключительно ядрышковую локализацию. Частицы золота были выявлены на границе ФЦ-ПФК и над плотным фибриллярным компонентом (рис. 3).

По количественному распределению метки антител к фибрилларину в ядрышке переходная зона ФЦ-ПФК была меченой значительно меньше, чем в контроле — $2,52 \pm 0,66$ гранул золота на 1 мкм^2 . Количество метки, локализованной в плотном фибриллярном компоненте, было меньшим по сравнению с контролем — $0,50 \pm 0,18$ гранул золота на 1 мкм^2 (таблица и рис. 2).

Обсуждение полученных данных. В контроле с использованием мечения антителами к фибрилларину на ультраструктурном уровне фибрилларин был локализован на периферии фибриллярных центров, т.е. в переходной зоне ФЦ-ПФК, и в плотном фибриллярном компоненте, причем переходная зона ФЦ-ПФК содержала в пять раз большее количество метки, чем плотный фибриллярный компонент. Выявленная нами высокая концентрация фибрилларина в переходной зоне ФЦ-ПФК хорошо согласуется с результатами исследований Ширы с соавт. [21], которые показали, что фибрилларин является компонентом терминальных шариков (balls) синтезирующихся молекул рРНК. Это позволило сделать вывод, что фибрилларин принимает участие в ранних

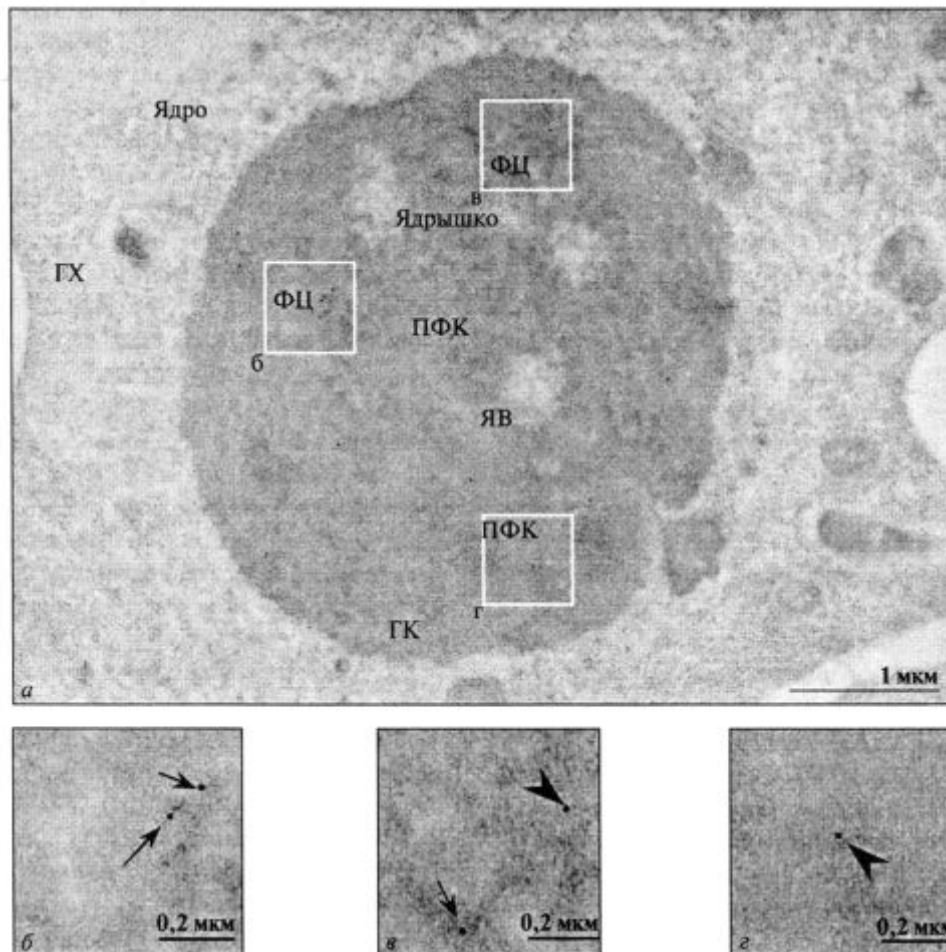


Рис. 1. Иммуноцитохимическая локализация фибрилларина в контроле: *а* — фрагмент меристематической клетки; *б, в, г* — фрагменты рис. 1, *а*, показанные при больших увеличениях. Условные обозначения здесь и на рис. 3: ФЦ — фибриллярный центр; ПФК — плотный фибриллярный компонент; ГК — гранулярный компонент; ЯВ — ядрышковая вакуоль; ГХ — гетерохроматин; стрелки — наличие метки в переходной зоне ФЦ-ПФК; головки стрелок — наличие метки в ПФК

Количественный анализ распределения метки антител к фибрилларину в ядрышковых субкомпонентах в контроле и в условиях измененной гравитации, количество гранул золота/мкм²

Показатель	ФЦ+переходная зона ФЦ-ПФК	ПФК
Контроль	8,10 ± 2,35	1,56 ± 0,24
Опыт	2,52 ± 0,66*	0,50 ± 0,18***

Примечание. Среднее ± стандартное отклонение, *p < 0,05, ***p < 0,001.

стадиях процессинга рРНК [22, 23]. Однако много других посттранскрипционных событий в рибосомном биогенезе также зависят от фибрилларина [14]. Неравномерное распределение фибрилларина в ядрышке было показано для *Allium sera* Карсером с соавт. [24] и Серидо с соавт. [12]. Данные, полученные этими авторами, легли в основу модели функциональной архитектуры

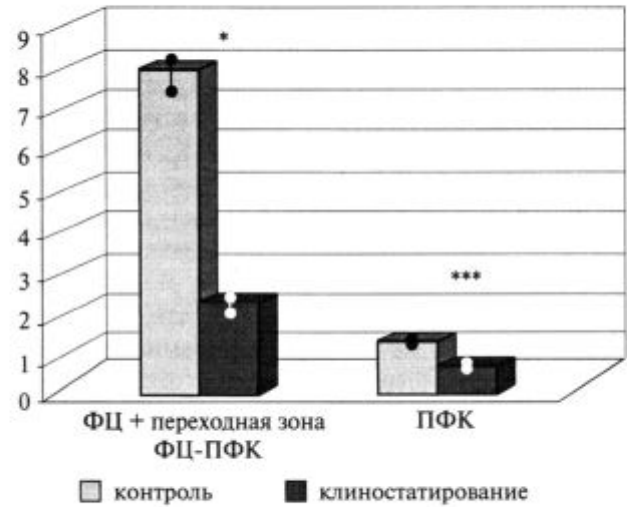


Рис. 2. Гистограмма плотности мечения антителами к фибрилларину ядрышка в контроле и в условиях измененной гравитации: по вертикали — количество гранул золота на 1 мкм²

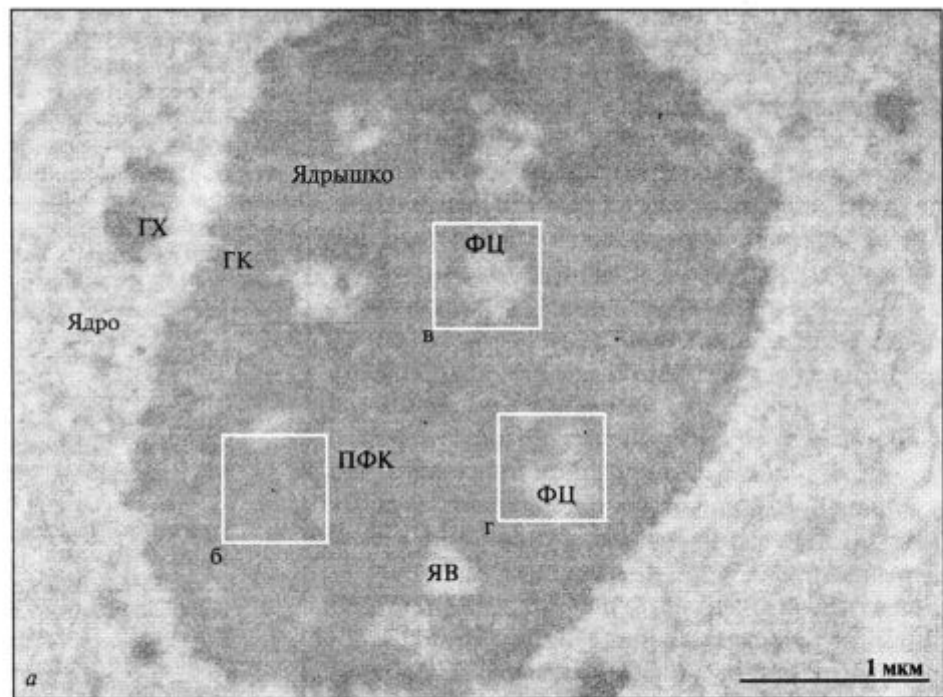


Рис. 3. Иммуноцитохимическая локализация фибрилларина в условиях измененной гравитации; а — фрагмент меристематической клетки; б, в, з — фрагменты рис. 3, а, показанные при больших увеличениях



ядрышка. В соответствии с ней фибриллярные центры являются фокусами аккумуляции рДНК, которая преимущественно транскрибируется в дискретных локусах на периферии фибриллярных центров. Рибосомальная ДНК, протянутая сквозь плотный фибриллярный компонент, соединяет фибриллярные центры между собой и содержит транскрипционно-активные участки. Эта модель хорошо согласуется с результатами, полученными нами для кресс-салата. Мы полагаем, что зоны, меченные антителами к фибрилларину, соответствуют зонам прохождения процессинга молекул пре-рРНК, ассоциированных с РНП-комплексами или процессорами [11], одним из элементов которых является фибрилларин. Локализация фибрилларина вокруг фибриллярных центров в переходной зоне ФЦ-ДФК свидетельствует о прохождении процессов созревания рРНК на их периферии. Фибрилларин, локализованный в плотном фибриллярном компоненте, задействован в дальнейшем процессинге молекул пре-рРНК.

В условиях измененной гравитации мы продемонстрировали уменьшение в три раза количества фибрилларина в переходной зоне ФЦ-ДФК по сравнению с контролем, что позволило нам предположить снижение уровня раннего процессинга рРНК. Выявленное уменьшение количества фибрилларина в плотном фибриллярном компоненте в три раза дало нам возможность высказать предположение о снижении уровня процессинга рРНК и на последующих его этапах, что приводит к уменьшению относительного объема плотного фибриллярного компонента по сравнению с контролем [25]. Было продемонстрировано, что уменьшение количества фибрилларина соответствует снижению уровня функционирования ядрышка и, наоборот, повышение функциональной активности ядрышка коррелирует с увеличением количества фибрилларина [26–31]. Эти результаты опровергают положение о фибрилларине как простом структурном белке ядрышек растительных клеток и его независимости от транскрипционной активности р-генов [32].

Выявленные нами в условиях клиностатирования изменения количества одного из важнейших белков процессинга пре-рРНК — фибрилларина в ядрышковых субкомпонентах свидетельствуют о снижении уровня процессинга рРНК, что позволяет установить снижение уровня функцио-

нальной активности ядрышек под влиянием измененной гравитации. Полученные результаты относительно динамики изменений в ядрышковых субкомпонентах фибрилларина могут быть использованы в биотестировании влияния на растения реальной микрогравитации в космических экспериментах, а также других неблагоприятных факторов.

Работа поддержана грантом INTAS №YSF 2001/2–144.

SUMMARY. For the first time, in altered gravity, with anti-fibrillarin antibodies and immunogold microscopy fibrillarin that is one of the most important proteins of rRNA processing was localized. The quantitative study of the density of gold particles in the nucleolus, under clinorotation both the transition zone FC-DFC and the dense fibrillar component were less labeled as compared to the control. Obtained data allow us to suppose the lowering of the rRNA processing level in the nucleoli under the influence of altered gravity.

РЕЗЮМЕ. Вперше в умовах зміненої гравітації з використанням ультраструктурної імуноцитохімії з антитілами до фібріларину, а також з використанням трансмісійної електронної мікроскопії локалізований фібріларин — один з найважливіших білків процесингу рРНК. За кількісним розподілом мітки антитіл до фібріларину в ядрі в умовах кліностатування виявлено зменшення мічення як перехідної зони ФЦ-ДФК, так і щільного фібрілярного компоненту порівняно з контролем. Отримані дані дозволяють припустити зниження рівня процесингу рРНК в ядрах під впливом зміненої гравітації.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кордюм Е.Л., Сытник К.М., Белявская Н.А., Жадько С.И., Климчук Д.А., Полулях Ю.А. Современные проблемы космической клеточной фитобиологии. — М.: Наука, 1994. — 293 с.
2. Claassen D.E., Spooner B.S. Impact of altered gravity on aspects of cell biology // *Int. Rev. Cytol.* — 1994. — 156. — P. 301–373.
3. Kordyum E.L. Biology of plant cells in microgravity and under clinostating // *Int. Rev. Cytol.* — 1997. — 171. — P. 1–78.
4. Делоне Н.Л., Антипов В.В., Воронков Ю.И. Влияние невесомости на экспрессию генов // Биоспутники «Космос». — М., 1991. — С. 34–55.
5. Попова А.Ф., Сытник К.М., Кордюм Е.Л., Нечитайло Г.С. Ультраструктурная организация клеток хлореллы, культивируемой на твердой среде в условиях микрогравитации // Докл. АН УССР. Сер. Б. — 1991. — № 8. — С. 161–164.
6. Рахленко К.Д., Савик З.Ф. Влияние факторов космического полета на ультраструктуру скелетных мышц // Космич. биология и авиакосмич. медицина. — 1991. — 15, № 1. — С. 72–76.

7. Hensel W., Iversen T.-H. Ethylene production during clinostat rotation and effect on root geotropism // *Ztschr. Pflanzenphysiol.* — 1990. — **97**, № 4. — P. 343–352.
8. Kordyum E.L., Sytnik K.M. Biological effects of weightlessness at cellular and subcellular levels // *Physiologist.* — 1983. — **26**, № 6, suppl. — P. 141–142.
9. Dedolph R.R., Nagvi S.M., Gordon S.A. The effect of gravity compensation on the geotropic sensitivity of *Avena* seedlings // *Plant Physiol.* — 1965. — **40**. — P. 961–965.
10. Shen-Miller J., Hinchman R.R. Threshold for the georeponse to acceleration in gravity compensated *Avena* seedlings // *Plant Physiol.* — 1968. — **43**. — P. 338–344.
11. Medina F.J., Cerdido A., Fernandez-Gomez M.E. Components of the nucleolar processing complex (pre-rRNA, fibrillarin, and nucleolin) colocalize during mitosis and are incorporated to daughter cell nucleoli // *Exp. Cell Res.* — 1995. — **221**. — P. 111–125.
12. Cerdido A., Medina F.J. Subnucleolar location of fibrillarin and variation in its levels during the cell cycle and during differentiation of plant cells // *Chromosoma.* — 1995. — **103**. — P. 625–634.
13. Schimmang T., Tollervey D., Kern H., Frank R., Hurt E.C. A yeast nucleolar protein related to mammalian fibrillarin is associated with small nucleolar RNA and is essential for viability // *EMBO J.* — 1989. — **8**. — P. 4015–4024.
14. Tollervey D., Lehtonen H., Jansen R., Kern H., Hurt E.C. Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly // *Cell.* — 1993. — **72**. — P. 443–457.
15. Girard J.-P., Lehtonen H., Caizergues-Ferrer M., Amalric F., Tollervey D., Lapeyre B. GAR1 is an essential small nucleolar RNP protein required for pre-rRNA processing in yeast // *EMBO J.* — 1992. — **11**. — P. 673–682.
16. Testillano P.S., Gorab E., Risueño M.C. A new approach to map transcription sites at the ultrastructural level // *J. Histochem. Cytochem.* — 1994. — **42**. — P. 1–10.
17. Medina F.J., Cerdido A., Carcer G. The functional organization of the nucleolus in proliferating plant cells // *Eur. J. Histochem.* — 2000. — **44**. — P. 117–131.
18. Hilaire E., Guikema J.A., Brown C.S. Clinorotation affects soybean seedling morphology // *J. Gravit. Physiol.* — 1995. — **2**. — P. 149–150.
19. Kordyum E.L. Effects of altered gravity on plant cell processes: Results of recent space and clinostatic experiments // *Adv. Space Res.* — 1994. — **14**, № 8. — P. 77–85.
20. Reimer G., Pollard K.M., Penning C.A., Ochs R.L., Lischwe M.A., Busch H., Tan E.M. Monoclonal autoantibody from a (New Zealand black × New Zealand white) F1 mouse and some human scleroderma sera target an Mr 34.000 nucleolar protein of the U3 RNP particle // *Arthritis and Rheumatism.* — 1987. — **30**, № 7. — P. 793–800.
21. Scheer U., Benavente R. Functional and dynamic aspects of the mammalian nucleolus // *Bio. Essays.* — 1990. — **12**. — P. 14–21.
22. Kass S., Tyc K., Steitz J.A., Sollner-Webb B. The U3 small nucleolar ribonucleoprotein functions in the first step of preribosomal RNA processing // *Cell.* — 1990. — **60**. — P. 897–908.
23. Tollervey D., Lehtonen H., Carmo-Fonseca M., Hurt E.C. The small nucleolar RNP protein NOP1 (fibrillarin) is required for pre-rRNA processing in yeast // *EMBO J.* — 1991. — **10**. — P. 573–583.
24. Carcer G., Medina F.J. Simultaneous localization of transcription and early processing markers allows dissection of functional domains in the plant cell nucleolus // *J. Struct. Biol.* — 1999. — **128**. — P. 139–151.
25. Соболев М.А. Вплив кліностатування та мікрогравітації на ультраструктуру та функції ядерців рослинних клітин // *Косміч. наука і технологія.* — 2001. — **7**, № 1. — С. 183–186.
26. Haaf T., Steinlein C., Schmid M. Nucleolar transcriptional activity in mouse Sertoli cells is dependent on centromere arrangement // *Exp. Cell Res.* — 1990. — **191**. — P. 157–160.
27. Morcillo G., Krimer D.B., De La Torre C. Modification of nucleolar components by growth temperature in meristems // *Exp. Cell Res.* — 1978. — **115**. — P. 95–102.
28. Moreno Diaz De La Espina S., Medina F.J., Risueño M.C. Correlation of nucleolar activity and nucleolar vacuolation in plant cells // *Eur. J. Cell Biol.* — 1980. — **22**. — P. 724–729.
29. Ochs R.L., Lischwe M.A., Spohn W.H., Busch H. Fibrillarin: a new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera // *Biol. Cell* — 1985. — **54**. — P. 123–134.
30. Ochs R.L., Smetana K. Detection of fibrillarin in nucleolar remnants and the nucleolar matrix // *Exp. Cell Res.* — 1991. — **197**. — P. 183–190.
31. Sacristán-Gárate A., Navarrete M.H., De La Torre C. Nucleolar development in the interphase of the cell cycle // *J. Cell Sci.* — 1974. — **16**. — P. 333–347.
32. Testillano P.S., Sanchez-Pina M.A., Lopez-Iglesias C., Olmedilla A., Christensen M.E., Risueño M.C. Distribution of B-36 nucleolar protein in relation to transcriptional activity in plant cells // *Chromosoma.* — 1992. — **102**. — P. 41–49.

Поступила 10.02.03