



УДК 577.112.855

СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ НОВОГО БЕЛКА ЯДРЫШКА Surf-6 В КЛЕТКАХ МЫШИ 3Т3

© 2005 г. В. В. Гурченков* **, М. А. Ползиков*, К. Магоулас***, Л. Г. Романова*, О. В. Зацепина**

*Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

**Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета, Москва;

***Университет Королевы Мэри, Лондон E1 4NS, Великобритания

Поступила в редакцию 29.12.2004 г. Принята к печати 27.01.2005 г.

Изучение локализации специфического белка ядрышек клеток эукариот Surf-6 в митозе и его чувствительности к обработке клеток РНКазой А или ДНКазой I *in situ* показало, что в интерфазных ядрышках клеток культуры мыши 3Т3 Surf-6, вероятно, связан с РНК и практически не связан с ДНК. В митозе Surf-6 появляется в формирующихся ядрышках после известных РНК-связывающих белков – фибрилларина и В23/нуклеофозмина, которые участвуют в ранних и поздних стадиях сборки рибосомных частиц соответственно. На основании этих наблюдений, а также принимая во внимание закономерности миграции ранних и поздних белков сборки рибосом в ядрышки в телофазе митоза, можно высказать предположение, что в клетках мыши Surf-6 принимает участие в терминальных стадиях сборки рибосомных частиц. Анализ уровня Surf-6 в синхронизированных клетках 3Т3 с помощью иммуноблотов впервые показал, что белок Surf-6 присутствует в клетках на всех стадиях клеточного цикла, но его содержание заметно снижается при выходе клеток в G0-период. Напротив, активация клеток к пролиферации сопровождается повышением содержания Surf-6. Эти наблюдения позволяют рассматривать белок Surf-6 в качестве маркера пролиферативного состояния клеток и предполагают его участие в регуляции клеточного цикла.

Ключевые слова: ядрышко; белок Surf-6; клеточный цикл; митоз; фибрилларин; В23/нуклеофозмин.

ВВЕДЕНИЕ

Согласно последним данным масс-спектрометрического анализа, ядрышки клеток человека содержат около 300 [1] или даже 400 [2, 3] белков. Значительная их часть представлена факторами, участвующими в транскрипции рибосомных генов (рДНК), процессинге новообразованных транскриптов пре-рРНК и сборке пре-рибосомных частиц, т.е. необходима для осуществления основной функции ядрышка – синтеза рибосом [4, 5]. Однако около трети белков, выявляемых в составе выделенных ядрышек, изучены плохо, а их роль в клеточном метаболизме до сих пор остается не выясненной. К таким белкам относится, в частности, специфический белок ядрышка Surf-6. Этот белок впервые описан в 1996 г. как продукт экспрессии гена *Surf-6*, являющегося одним из членов локуса *Surfeit* в геноме мыши [6]. Позднее ортологи Surf-6 были описаны в геномах других высших эукари-

от, включая человека [7, 8], амфибий [9], рыб [10] и насекомых [11], что указывает на его высокую эволюционную консервативность. У мыши белок Surf-6 имеет электрофоретическую подвижность, соответствующую мол. массе около 43 кДа, и состоит из 355 а. о., из которых 28% приходится на долю аргинина и лизина, обуславливающих сильно положительный заряд молекулы (pI 10) [6]. Уникальным свойством Surf-6 является отсутствие в его составе каких-либо известных консервусных последовательностей, которые могли бы косвенно указывать на роль белка в метаболизме клетки.

К известным характеристикам Surf-6 относятся его преимущественная локализация в гранулярной части ядрышка, а также высокое сродство к нуклеиновым кислотам, в первую очередь к РНК, в системе *in vitro* [6, 12]. Транскрипты Surf-6 присутствуют в различных тканях и органах мыши [6]. В совокупности, эти наблюдения позволили сделать заключение о том, что Surf-6 является белком “домашнего хозяйства”, возможной функцией которого является участие в сборке рибосомных частиц. Однако данные о связи белка Surf-6 с РНК ядрышек *in situ*, которые могли бы подтвердить

Сокращения: рДНК и рРНК – рибосомная ДНК и РНК; BrdU – бромированный дезоксиуридин; PBS – стандартный фосфатно-солевой буфер; PMSF – фенилметилсульфонилфторид; DAPI – 4',6'-диамидинофенилиндола.

Автор для переписки (тел.: (095) 779-23-66; факс: (095) 335-71-03; эл. почта: zatscpina_olga@mail.ibch.ru).

правильность предположения об участии Surf-6 в биогенезе рибосом, до сих пор отсутствуют. Одним из подходов к ответу на этот вопрос может быть обработка клеток соответствующими нуклеазами на стадиях, предшествующих иммуномечению клеток антителом к Surf-6. Ранее аналогичные воздействия были использованы для изучения возможного взаимодействия белков хроматина (например, гистонов [13]) и ядрышка (например, B23 и фибрилларина [14–16]) с РНК или ДНК. В настоящей работе мы изучили характер иммуномечения ядрышек клеток мыши 3Т3 антителами к Surf-6 после обработки клеток РНКазой А или ДНКазой I *in situ*.

Хорошо известно, что при вступлении клеток в митоз ядрышко распадается, а его белки ассоциируют с хромосомами и находятся в цитоплазме вплоть до начала реформирования ядрышка в конце митоза. Согласно многочисленным наблюдениям, порядок миграции белков в реформирующиеся ядрышки в телофазе митоза определяется стадией биогенеза рибосом, в которой тот или иной белок участвует. Так, фибрилларин – белок, участвующий в ранних стадиях созревания предшественников рРНК, появляется в дочерних ядрышках сразу после возобновления транскрипции рДНК в анафазе, тогда как белки поздних стадий процессинга рРНК – Nor52 и B23 – мигрируют в ядрышки только в конце митоза, т.е. после фибрилларина [16–19]. Принимая во внимание эти закономерности, в настоящей работе мы сравнили динамику появления Surf-6 в телофазных ядрышках клеток мыши 3Т3 с таковой для фибрилларина и B23 путем двойного иммуномечения клеток антителами к перечисленным белкам.

Как указывалось выше, Surf-6 является белком “домашнего хозяйства”, поскольку Surf-6 и его транскрипты выявляются в разных тканях и органах мыши [6]. Однако анализ содержания белка Surf-6 в клетках мыши, находящихся на разных стадиях клеточного цикла, на сегодняшний день не производился. Для изучения возможной роли Surf-6 в регуляции клеточного цикла мы определили уровень экспрессии Surf-6 в синхронизированных клетках 3Т3 с помощью иммуоблотов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Локализация Surf-6 в клетках 3Т3 в интерфазе и митозе. Локализация белка Surf-6 в интерфазе и на основных стадиях митоза показана на рис. 1. В интерфазных клетках Surf-6 располагается практически по всему ядрышку и отсутствует в нуклеоплазме и цитоплазме (рис. 1а–в). При вступлении клеток в митоз и начале распада ядрышка в профазе (рис. 1г, д) белок мигрирует из ядрышек в ядро, где располагается в межхромосомных районах. В прометафазе (рис. 1е, ж) и метафазе (рис. 1з, и) Surf-6 локализуется на поверхности хромосом и

в цитоплазме. Отдельные участки клетки, более ярко окрашенные антителами к Surf-6, вероятно, соответствуют остаточным ядрышкам (рис. 1г–ж). В анафазе (рис. 1к, л) Surf-6 располагается в основном в цитоплазме и слабо декорирует хромосомы. В телофазе белок отчетливо проявляется в составе проядрышек и новообразующихся ядрышек и практически отсутствует в цитоплазме (рис. 1м, н). Таким образом, поведение Surf-6 в митозе полностью соответствует поведению известных белков ядрышка, которые участвуют в процессинге рРНК – фибрилларину и B23 [14, 16, 18, 19].

Хорошо известно, что сборка ядрышка в телофазе митоза представляет собой многоступенчатый процесс, основными стадиями которого являются возобновление транскрипции рибосомных генов, миграция в ядрышкообразующие районы (формирующиеся ядрышки) белка раннего процессинга рРНК – фибрилларина, затем – нуклеолина и, наконец, белков позднего процессинга рРНК – Nor52 и B23 [16, 17, 19]. Эти и другие наблюдения позволяют сделать вывод о том, что белки ранних стадий созревания рРНК мигрируют в новообразующиеся ядрышки раньше белков позднего процессинга рРНК [5].

Для того чтобы ответить на вопрос, в каких этапах созревания рРНК – начальных или терминальных – может участвовать белок Surf-6, мы провели двойное иммуномечение телофазных клеток антителами к Surf-6 и фибрилларину (рис. 2а–е), к Surf-6 и B23 (рис. 2ж–м), а также к фибрилларину и B23 (не иллюстрировано). Как видно из рис. 2б, локальные скопления фибрилларина в реформирующихся ядрах, соответствующие “новым” ядрышкам, обнаруживаются в клетках мыши 3Т3 уже на стадии ранней телофазы, что полностью соответствует известным литературным данным о поведении этого белка в телофазе митоза, полученным на других объектах [16, 18, 19]. Однако в тех же клетках Surf-6 располагается, главным образом, в районе хромосом и не выявляется в составе “новых” ядрышек (рис. 2а). Ранние телофазные ядрышки не содержат также белка B23 (не иллюстрировано, см. [16]). На стадии средней телофазы (рис. 2ж–и), отличительный признак которой – начало деконденсации хромосом, в ядрышках отчетливо проявляется белок B23 (рис. 2з), что также находится в хорошем соответствии с литературными данными [16, 18, 19]. Однако во многих клетках B23-положительные ядрышки не окрашиваются на Surf-6 (рис. 2ж). Все три белка – фибрилларин, B23 и Surf-6 – проявляются в “новых” ядрышках только в самом конце митоза (рис. 2г–е, к–м). Эти наблюдения говорят о том, что в телофазе митоза Surf-6 мигрирует в дочерние ядрышки позднее обоих маркерных белков (т.е. фибрилларина и B23) и, следовательно, принимает участие в наиболее поздних стадиях созревания рибосомных частиц. В пользу этого заклю-

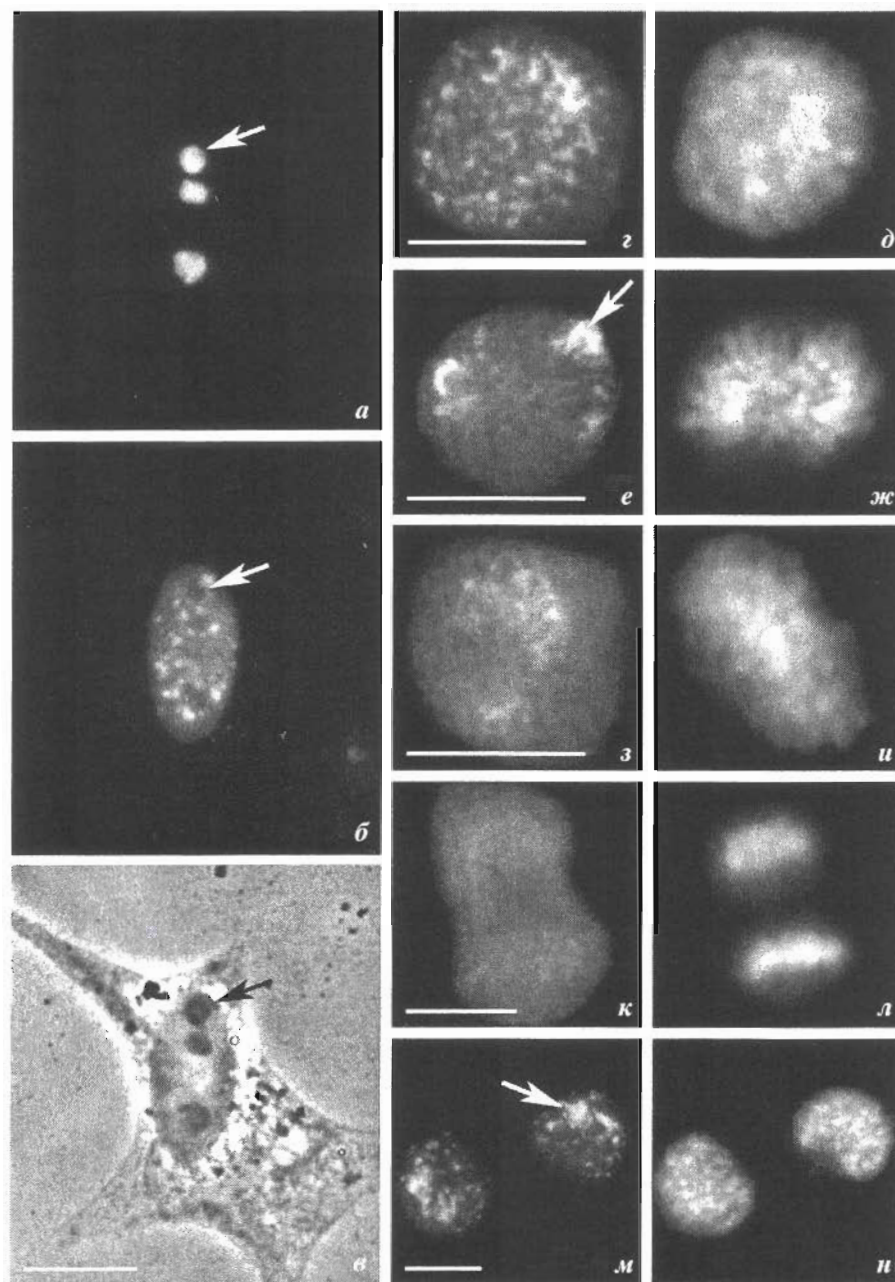


Рис. 1. Локализация белка Surf-6 в интерфазных (а–в) и митотических (г–н) клетках мыши 3Т3; а, г, е, з, к, м – окраска антителом к Surf-6; б, д, ж, и, л, н – окраска хроматина и хромосом красителем DAPI; в – общий вид клетки, изображенной на рис. а и б, под фазовым контрастом. Стрелки – ядрышки. Масштабные линейки – 10 мкм.

чения говорят также наши данные о том, что ортологом Surf-6 у пекарских дрожжей является белок Rrp14 [20], который, согласно литературным сведениям, принимает участие в биогенезе рибосом [21], и тот факт, что белковый партнер Rrp14 – Ssf1p – необходим для созревания большой прерибосомной субъединицы [22].

Обработка клеток нуклеазами. Одним из известных свойств белка Surf-6 является его способность взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами в бесклеточной системе *in vitro* [12]. Для то-

го чтобы выяснить, связан ли Surf-6 с РНК и ДНК в ядрышках *in situ*, клетки 3Т3 обрабатывали нуклеазами до инкубации со специфическими антителами к белку. Обработке РНКазой А подвергали как фиксированные, так и нефиксированные клетки. В обоих случаях были получены одинаковые результаты, хотя фиксация клеток параформальдегидом требовала более длительного воздействия РНКазы А. Кроме того, инкубация нефиксированных клеток с РНКазой А приводила к откреплению большого числа делящихся клеток

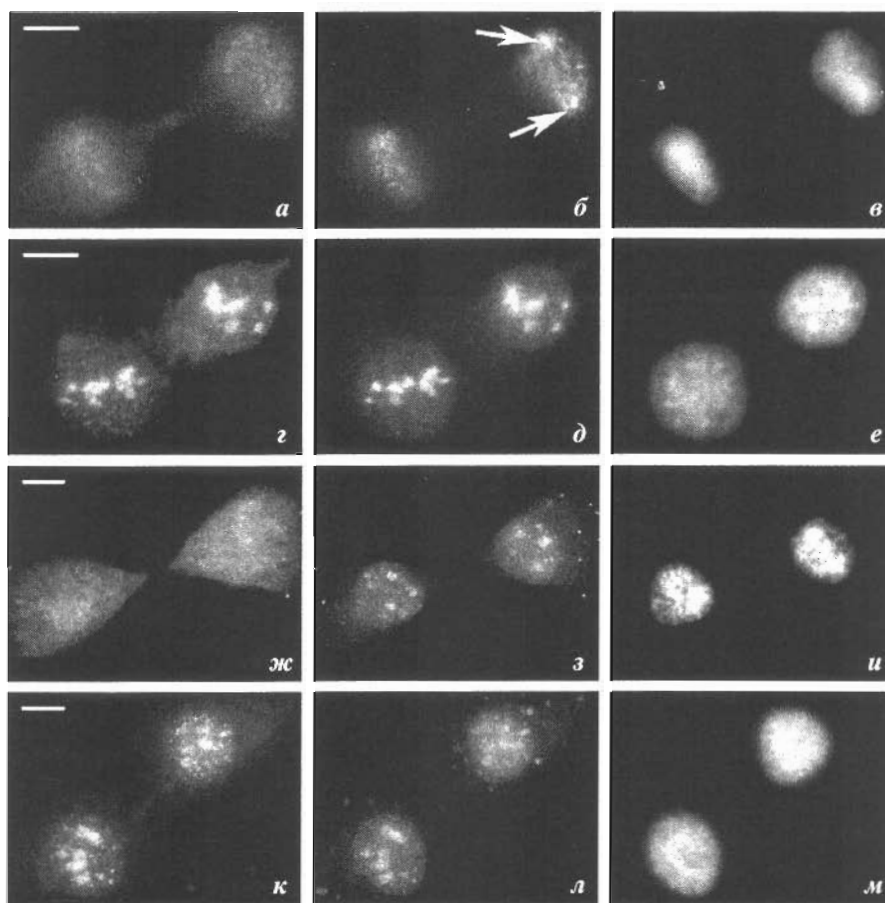


Рис. 2. Двойное иммуномечение клеток 3Т3 антителами к Surf-6 (а, г) и фибрилларину (б, д), и Surf-6 (ж, к) и B23 (з, л) в ранней (а–в), средней (ж–и) и поздней (г–е, к–м) телофазах митоза; в, е, и, м – окраска хромосом красителем DAPI. Стрелками показаны ядрышки. Масштабные линейки – 10 мкм.

от субстрата, поэтому реакцию Surf-6 на воздействии РНКазы А в метафазе митоза изучали только на фиксированных препаратах.

Воздействие РНКазы А на нефиксированные (рис. 3а–е) или фиксированные интерфазные клетки (рис. 3г–е) не изменяло общей морфологии ядер, ядрышек и хроматина. В ядрах отчетливо проявлялись блоки центрального гетерохроматина (хромоцентры), а также дисперсный эухроматин, который гомогенно окрашивался DAPI (рис. 3б, д). Как видно на рис. 3а, г, воздействие РНКазы А полностью препятствовало иммуномечению ядрышек антителом к Surf-6; в обработанных клетках антитела окрашивали, главным образом, нуклеоплазму. В контрольных клетках, не обработанных РНКазой А, характер окрашивания ядрышек антителами к Surf-6 не отличался от обычного (см. рис. 1а). Характерно, что воздействие РНКазы А на метафазные клетки не препятствовало выявлению Surf-6 на поверхности хромосом (рис. 3ж, з). Таким образом, можно сделать вывод о том, что обработка клеток РНКазой А полностью препятствует окрашиванию ядры-

шек антителами к Surf-6. Поскольку основным типом РНК ядрышек является рРНК на разных стадиях созревания [4], это наблюдение является первым свидетельством в пользу возможного взаимодействия Surf-6 с рРНК *in situ*.

Чувствительность ядрышкового пула Surf-6 к обработке клеток РНКазой А находится в полном соответствии с его высокой РНК-связывающей активностью, которая проявляется *in vitro* [12]. Свойства, характерные для Surf-6, ранее описаны только для белка ядрышка B23, который непосредственно взаимодействует с рРНК *in vitro* [23, 24] и, подобно Surf-6, перестает выявляться в ядрышках после их обработки РНКазой А [15]. Повышенная резистентность перихромосомного слоя к РНКазе А в метафазе митоза может указывать на особенности взаимодействия Surf-6 с рРНК после распада ядрышка или даже на отсутствие таких взаимодействий.

Результаты обработки нефиксированных клеток ДНКазой I и последующей окраски на Surf-6 и B23 представлены на рис. 3и–м. На рис. 3и–р показаны контрольные клетки, которые были ин-

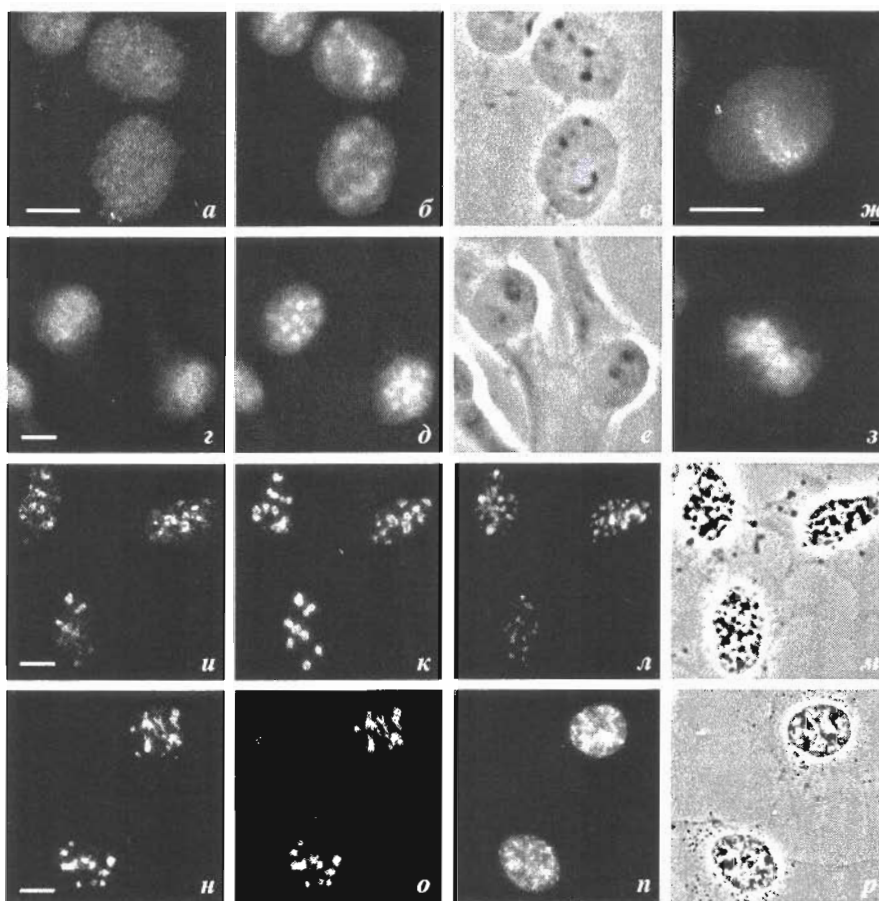


Рис. 3. Окраска клеток 3Т3 антителами к Surf-6 (*а, г, ж, и, н*) и В23 (*к, о*) после обработки РНКазой А (*а–з*) или ДНКазой I (*и–м*) в интерфазе (*а–е, и–р*) и метафазе митоза (*ж, з*); *а–в, и–р* – результат обработки нефиксированных клеток, *г–з* – обработка клеток после фиксации параформальдегидом; *и–р* – контроль к обработке ДНКазой I; *б, д, з, л, н* – окраска хроматина и хромосом красителем DAPI; *в, е, м, р* – фазово-контрастные изображения клеток, показанных на рис. *а и б, г и д, и–л и н–п* соответственно. Масштабные линейки – 10 мкм.

кубированы в тех же условиях, но в отсутствие нуклеазы. Как видно из рис. 3л, воздействие ДНКазы I приводило к полному исчезновению окраски диффузного хроматина (эухроматина) красителем DAPI, хотя в тех же клетках ядрышки сохранялись и могли быть идентифицированы в режиме фазового контраста (рис. 3м). Помимо ядрышек в ядрах выявлялись также многочисленные хромоцентры, оптическая плотность которых увеличивалась в присутствии ионов Mg^{+2} , добавляемых в инкубационную среду для поддержания активности ДНКазы I. Повышенную устойчивость гетерохроматина в клетках мыши к действию нуклеазы можно объяснить высокой плотностью упаковки их материала, которая была описана в ряде работ [25, 26]. В условиях негативного окрашивания эухроматина красителем DAPI ядрышки окрашивались на Surf-6 (рис. 3и) и В23 (рис. 3к). В целом характер иммуноочечнения ядрышек не отличался от такового в контрольных, т.е. не обработанных ДНКазой I, клетках (рис. 3н, о). Таким образом, нам не удалось полу-

чить убедительных данных в пользу возможного взаимодействия Surf-6 с ДНК ядрышка [12], поскольку обработка клеток ДНКазой I не препятствовала окраске ядрышек антителами к Surf-6 (рис. 3и). Об отсутствии связи Surf-6 с ДНК *in situ* косвенно говорит также поведение Surf-6 в митозе. Действительно, все специфические белки ядрышка, которые ассоциированы с ДНК (рДНК), включая РНК-полимеразу I и ее факторы транскрипции – белки UBF, ТВР, ТАФ, во время митоза сохраняют связь с районами ядрышковых организаторов и отсутствуют в других участках клетки [27–29]. В отличие от этих белков, Surf-6 располагался на поверхности хромосом, в цитоплазме и в составе проядрышек (рис. 1г–н), подобно белкам, участвующим в созревании рРНК – фибрилларину и В23.

Содержание белка Surf-6 в клетках в различные периоды клеточного цикла. Известно, что Surf-6 является белком “домашнего хозяйства”, а его транскрипты выявляются в клетках разных тканей одного организма [6]. В настоящей работе

мы впервые изучили содержание Surf-6 в динамике клеточного цикла, а также после выхода клеток из цикла в G0-период. Контроль синхронизации клеток 3Т3 производили путем включения аналога тимидина – BrdU. Наши наблюдения показали, что в используемой культуре продолжительность митотического цикла составляет в среднем 21 ч. Из них G1-период длится около 6.5 ч, S-период – 10 ч, а G2-период – 3–3.5 ч. Инкубация клеток 3Т3 в среде, содержащей 0.1% сыворотки, в течение 48 ч приводила к практически полному исчезновению клеток, включающих BrdU, а также к полному исчезновению митотических клеток. Через 6 и 13 ч после переноса таких клеток в среду полного состава BrdU включался в ядра 5–10 и 60–70% клеток соответственно. Эти наблюдения позволяют полагать, что через 6 ч большая часть клеток находилась в G1-периоде, а через 13 ч – в S-периоде митотического цикла. Через 18 ч после начала инкубации в среде полного состава, содержащей нокодазол, в культуре вновь преобладали немеченые клетки. Это говорит о том, что на этот срок большинство клеток находится в G2-периоде. В асинхронной культуре количество клеток, включающих BrdU, обычно составляло 30–40%.

Содержание белка в асинхронных клетках, а также в клетках, преимущественно находящихся в G0-, G1-, S- и G2-периодах интерфазы, было определено с помощью иммуноблотов (рис. 4). Как ожидалось на основании более ранних наблюдений [12], в асинхронной культуре клеток 3Т3 антитела к Surf-6 выявляли одну полосу в районе 43 кДа (рис. 4а). Наши наблюдения впервые показали, что электрофоретическая подвижность белка оставалась без видимых изменений в различные периоды митотического цикла, а также в G0-периоде (рис. 4б–д). Однако содержание Surf-6 в периоде “клеточного покоя” (дорожка б) было заметно меньше, чем в асинхронной культуре (дорожка а). При вхождении клеток в митотический цикл содержание Surf-6 прогрессивно возрастало (дорожка в – G1-период, дорожка г – S-период), достигая максимальных значений в G2-периоде (дорожка д).

Таким образом, эти результаты впервые показали, что Surf-6 присутствует в клетках в течение всего клеточного цикла, но его уровень в покоящихся и пролиферирующих клетках резко различается (рис. 4). Данные наблюдения прямо указывают на то, что содержание Surf-6 в клетках является маркером их пролиферативной активности. Ранее аналогичные выводы были сделаны для двух других белков ядрышка, вовлеченных в процессинг рРНК – В23 и нуклеолина, синтез которых также понижается в “периоде покоя” и повышается от G1-периода к G2-периоду и митозу [30–32]. Показано также, что уровень экспрессии белка В23 в опухолевых клетках во много раз выше, чем в клетках нормальных тканей [33, 34]. На основании этих наблюдений можно ожидать, что

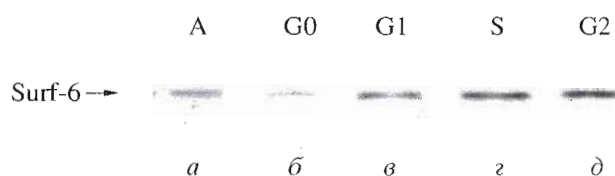


Рис. 4. Содержание Surf-6 в асинхронной культуре клеток 3Т3 (а) и в клетках, синхронизированных в G0- (б), G1- (в), S- (г) и G2- (д) периодах клеточного цикла; на каждую дорожку было нанесено 100 мкг тотального белка.

при малигнизации клеток синтез Surf-6 также будет увеличиваться. Экспериментальная проверка данного предположения может являться предметом будущих исследований.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что в клетках мыши специфический белок ядрышка Surf-6 связан с рРНК и принимает участие в терминальных стадиях сборки рибосомных частиц. Surf-6 присутствует на всех стадиях клеточного цикла, а уровень его синтеза положительно коррелирует с пролиферативным статусом клеток.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клетки культуры 3Т3 NIH выращивали в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, глутамин и антибиотики, при 37°C и 5% CO₂ и пересаживали дважды в неделю.

Антитела. В работе использовали следующие антитела: кроличьи поликлональные антитела к белку Surf-6 (разведение 1 : 100 [12]); мышинные моноклональные антитела к В23/нуклеофозмину (1 : 200; любезно предоставлены д-ром П.К. Чаном (Baylor College of Medicine, Houston, Texas, США [35]), аутоиммунную сыворотку человека к фибрилларину (1 : 100 [16]); мышинные моноклональные антитела к BrdU (1 : 20; Roche, Германия). В качестве вторичных антител использовали аффинноочищенные антитела к иммуноглобулинам мыши, кролика и человека, конъюгированные с Техасским красным или флуоресцеинизотиоцианатом (FITC), которые были приобретены у Jackson ImmunoResearch Lab. Co (США) и использованы в концентрациях, рекомендованных производителем. На всех этапах использования антитела разводили в стандартном фосфатно-солевом буфере PBS, pH 7.2–7.4 (0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄).

Непрямая иммуноцитохимия. Клетки фиксировали 2% параформальдегидом в PBS 20 мин при комнатной температуре и обрабатывали 0.5% Тритоном X-100 10 мин на льду. Тщательно промывали PBS, содержащим 2% обезжиренного сухого молока или 2% бычьего сывороточного аль-

бумина, и инкубировали с первичными антителами 1 ч при комнатной температуре во влажной камере. После промывки PBS, клетки инкубировали с вторичными антителами в течение 45 мин при комнатной температуре, окрашивали 0.1 мкг/мл DAPI (Sigma) и заключали в Мовиол, содержащий DABCO (1,4-диазобисцикло[2,2,2]октан, Sigma). Препараты изучали с помощью флуоресцентного микроскопа Axiovert 200 (Carl Zeiss, Германия), используя объективы 40x/ЧА 0.75 PlanNeofluar, 100x/ЧА 1.25 Fluor и 100x/ЧА 1.3 AchromPlan. Изображения записывали с помощью 13-битной монохромной камеры CoolSnap_{cf} (Roper Scientific, США) и обрабатывали, используя программу Adobe Photoshop, версия 6.

Обработка клеток РНКазой А. Нефиксированные клетки обрабатывали 0.1% Тритоном X-100 в течение 5 мин на льду и помещали в раствор РНКазы А (Sigma; 100 мкг/мл) в буфере PBS, содержащем 0.1 mM PMSF (Sigma), в течение 15 мин при 37°C, по методике, описанной ранее [13]. Клетки фиксировали, инкубировали с первичными, а затем вторичными антителами, докрашивали DAPI и заключали в Мовиол как описано выше. В параллельных сериях экспериментов клетки сначала фиксировали параформальдегидом, обрабатывали детергентом, а затем инкубировали с РНКазой А в течение 1 ч при 37°C как описано ранее [15]. Клетки тщательно промывали PBS, инкубировали с антителами, DAPI и заключали в Мовиол. В качестве контроля использовали клетки, обработанные буфером PBS, не содержащим РНКазу А.

Обработка клеток ДНКазой I. Нефиксированные клетки обрабатывали 0.1% Тритоном X-100 в течение 5 мин на льду, а затем помещали в буфер PBS, содержащий 100 мкг/мл ДНКазы I (Sigma), 0.1 mM PMSF и 5 mM MgCl₂, на 15 мин при 37°C. Клетки фиксировали, инкубировали с антителами, докрашивали DAPI и заключали в Мовиол как описано выше. В качестве контроля использовали клетки, которые обрабатывали в тех же условиях в буфере PBS, не содержащем нуклеазы.

Мечение клеток BrdU. Продолжительность клеточного цикла и его отдельных стадий определяли путем инкубации клеток с аналогом тимидина, BrdU, как описано ранее [36]. BrdU в конечной концентрации 20 mM добавляли в культуральную среду на 30 мин перед фиксацией клеток 2% параформальдегидом в PBS в течение 20 мин при комнатной температуре. Гидролиз ДНК производили 1 н. HCl 10 мин при комнатной температуре. После тщательной отмывки клетки инкубировали с антителами к BrdU, а затем – с антителами к иммуноглобулину мыши, конъюгированными с FITC. Препараты заключали в Мовиол и использовали для микроскопического анализа как описано выше.

Синхронизация клеток. После достижения клетками 70% конfluence (обычно на вторые сут-

ки после посадки), старую культуральную среду удаляли, клетки тщательно промывали PBS и помещали в среду DMEM, содержащую 0.1% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота на 72 ч (G0-период, 0–1% клеток, меченных BrdU). Затем клетки инкубировали в среде полного состава в течение 6 ч (для накопления клеток, находящихся в G1-периоде, 5–10% клеток, меченных BrdU) или в течение 13 ч (для накопления клеток, находящихся в S-периоде, около 65% клеток, меченных BrdU). Для накопления клеток в G2-периоде через 13 ч в среду добавляли 50 нг/мл нокодазола и инкубировали 6 ч. Число клеток, меченных BrdU, в такой культуре снижалось до 10%, а на препаратах появлялись одиночные К-митотические клетки.

Иммуноблоты. Анализ содержания белка Surf-6 проводили с помощью иммуноблотов, используя асинхронную культуру, а также синхронизированные клетки, получение которых описано выше. Клетки лизировали в стандартном буфере Лэммли. Тотальную концентрацию белков в лизатах определяли по методу Лоури с помощью набора Protein Assay Kit (Sigma), следуя рекомендациям производителя. На дорожки геля наносили по 100 мкг тотального белка для каждого образца и проводили разделение белков методом электрофореза в 12% SDS-ПААГ. После проведения электроблоттинга в 50 mM Трис-HCl-буфере (pH 8.3–8.5), содержащем 40 mM глицина, 0.1% SDS и 20% метанола, нитроцеллюлозную мембрану инкубировали с антителами к Surf-6, затем с антителами к иммуноглобулину кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена (Sigma), и проявляли методом хемилюминесценции, используя набор ECL + Plus (Amersham-Pharmacia, Великобритания).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 04-04-48391) и ИНТАС (грант № 03-55-0570).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Andersen J.S., Lyon C.E., Fox A.H., Leung A.K., Lam Y.W., Steen H., Mann M., Lamond A.I. // *Curr. Biol.* 2002. V. 12. P. 1–11.
2. Scherl A., Coute Y., Deon C., Calle A., Kindbeiter K., Sanchez J.C., Greco A., Hochstrasser D., Diaz J.J. // *Mol. Biol. Cell.* 2002. V. 13. P. 4100–4109.
3. Leung A.K., Andersen J.S., Mann M., Lamond A.I. // *Biochem. J.* 2003. V. 376. P. 553–569.
4. Hadjiolov A.A. *The Nucleolus and Ribosome Biogenesis.* Wien; New York: Springer-Verlag, 1985.
5. Olson M.O., Hingorani K., Szebeni A. // *Int. Rev. Cytol.* 2002. V. 219. P. 199–266.
6. Magoulas C., Fried M. // *DNA Cell Biol.* 1996. V. 15. P. 305–316.
7. Duhig T., Ruhrberg C., Mor O., Fried M. // *Genomics.* 1998. V. 52. P. 72–78.

8. Magoulas C., Fried M. // *Gene*. 2000. V. 243. P. 115–123.
9. Wolff C.M., Nguyen V.K., Remy P. // *DNA Seq.* 2002. V. 13. P. 149–152.
10. Armes N., Gilley J., Fried M. // *Genome Res.* 1997. V. 7. P. 1138–1152.
11. Trott R.L., Kalive M., Karandikar U., Rummer R., Bishop C.P., Bidwai A.P. // *Mol. Cell. Biochem.* 2001. V. 227. P. 91–98.
12. Magoulas C., Zatsepina O.V., Jordan P.W., Jordan E.G., Fried M. // *Eur. J. Cell Biol.* 1998. V. 75. P. 174–183.
13. Maison C., Bailly D., Peters A.H., Quivy J.P., Roche D., Taddei A., Lachner M., Jenuwein T., Almouzni G. // *Nat. Genet.* 2002. V. 30. P. 329–334.
14. Ochs R.L., Lischwe M.A., Spohn W.H., Busch H. // *Biol. Cell.* 1985. V. 54. P. 123–133.
15. Zatsepina O.V., Todorov I.T., Philipova R.N., Krachmarov C.P., Trendelenburg M.F., Jordan E.G. // *Eur. J. Cell Biol.* 1997. V. 73. P. 58–70.
16. Мухарьямова К.Ш., Дудник О.А., Сперанский А.И., Зацепина О.В. // *Биол. мембраны*. 1998. Т. 15. С. 657–669.
17. Savino T.M., Bastos R., Jansen E., Hernandez-Verdun D. // *J. Cell Sci.* 1999. V. 112. P. 1889–1900.
18. Dunder M., Misteli T., Olson M.O.J. // *J. Cell Biol.* 2000. V. 150. P. 433–446.
19. Savino T.M., Gebrane-Younes J., De Mey J., Sibarita J.B., Hernandez-Verdun D. // *J. Cell Biol.* 2001. V. 153. P. 1097–1110.
20. Polzikov M., Zatsepina O., Magoulas Ch. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 327. P. 143–149.
21. Horsey E.W., Jakovljevic J., Miles T.D., Harnpicharnchai P., Woolford J.L., Jr. // *RNA*. 2004. V. 10. P. 813–827.
22. Fatica A., Cronshaw A.D., Dlakic M., Tollervey D. // *Mol. Cell.* 2002. V. 9. P. 341–351.
23. Dumber T.S., Gentry G.A., Olson M.O. // *Biochemistry*. 1989. V. 28. P. 9495–9501.
24. Okuwaki M., Tsujimoto M., Nagata K. // *Mol. Biol. Cell.* 2002. V. 13. P. 2016–2030.
25. Stephanova E., Russanova V., Chentsov Y., Pashev I. // *Exp. Cell Res.* 1988. V. 179. P. 545–553.
26. Прусов А.Н., Зацепина О.В. // *Биохимия*. 2002. Т. 67. С. 508–517.
27. Zatsepina O.V., Voit R., Grummt I., Spring H., Semenov M.V., Trendelenburg M.F. // *Chromosoma*. 1993. V. 102. P. 599–611.
28. Jordan P., Mannervik M., Tora L., Carmo-Fonseca M. // *J. Cell Biol.* 1996. V. 133. P. 225–234.
29. Roussel P., Andre C., Comai L., Hernandez-Verdun D. // *J. Cell Biol.* 1996. V. 133. P. 235–246.
30. Derenzini M., Sirri V., Pession A., Trere D., Roussel P., Ochs R.L., Hernandez-Verdun D. // *Exp. Cell Res.* 1995. V. 219. P. 276–282.
31. Dergunova N.N., Bulycheva T.I., Artemenko E.G., Shpakova A.P., Pegova A.N., Gemjian E.G., Dudnik O.A., Zatsepina O.V., Malashenko O.S. // *Immunol. Lett.* 2002. V. 83. P. 67–72.
32. Derenzini M., Montanaro L., Chilla A., Tosti E., Vici M., Barbieri S., Govoni M., Mazzini G., Trere D. // *J. Cell Physiol.* 2004. V. 202. P. 483–491.
33. Feuerstein N., Mond J.J. // *J. Immunol.* 1987. V. 139. P. 1818–1822.
34. Feuerstein N., Chan P.K., Mond J.J. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. P. 10608–10612.
35. Zatsepina O.V., Rousselet A., Chan P.K., Olson M.O., Jordan E.G., Bornens M. // *J. Cell Sci.* 1999. V. 112. P. 455–466.
36. Uzbekov R., Chartrain I., Philippe M., Arlot-Bonnemains Y. // *Exp. Cell Res.* 1998. V. 242. P. 60–68.

Properties and Functions of a New Nucleolar Protein, Surf-6, in 3T3 Mouse Cells

V. V. Gurchenkov^{1,2}, M. A. Polzikov¹, Ch. Magoulas³, L. G. Romanova¹, and O. V. Zatsepina^{1#}

[#]Phone: +7 (095) 779-2366; fax: +7 (095) 335-7103; e-mail: zatsepina_olga@mail.ibch.ru

¹Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

²Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Moscow State University, Vorob'evy Gory, Moscow, 119899 Russia

³Queen Mary University, Mile End Road, London, E1 4NS, UK

The localization of the specific protein Surf-6 from nucleoli of eukaryotic cells in mitosis and its sensitivity to the treatment of cells with RNase A and DNase I *in situ* were studied. It was shown that, in interphase nucleoli of 3T3 mouse cells, Surf-6 is probably associated with RNA and practically is not associated with DNA. In mitosis, Surf-6 appears in forming nucleoli after the known RNA-binding proteins fibrillarin and B23/nucleofosmin, which are involved in the early and late stages of the assembly of ribosomal particles, respectively. These observations and the regularities of migration of early and late proteins of ribosome assembly to nucleoli in the telophase of mitosis led us to the presumption that Surf-6 is involved in the terminal stages of the assembly of ribosomal particles in murine cells. An immunoblot analysis of the Surf-6 content in synchronized 3T3 cells showed for the first time that Surf-6 is present at all stages of the cell cycle but its content markedly decreases when cells enter the G0 period. Conversely, the activation of cells for proliferation is accompanied by an increase in the Surf-6 content. These observations allow one to regard Surf-6 as a marker of the cell proliferative state and suggest its implication in the regulation of the cell cycle. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: B23/nucleofosmin, cell cycle, fibrillarin, mitosis, nucleolus, protein Surf-6