

УДК 612.664:576.315.3

**РАСПРЕДЕЛЕНИЕ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ I И БЕЛКОВ ATRX И SC35 В ЯДРАХ СЕКРЕТОРНЫХ
КЛЕТОК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЛАКТИРУЮЩИХ И НЕЛАКТИРУЮЩИХ КРЫС**

К.В.Тютин^{*}, И.О.Боголюбова^{}, Л.Г.Прошина**

**NUCLEAR DISTRIBUTION OF RNA POLYMERASE I, ATRX AND SC35 PROTEINS IN NUCLEI OF
SECRETORY CELLS OF MAMMARY GLAND OF LACTATING AND NON-LACTATING RATS**

K.V.Tyutina^{*}, I.O.Bogolyubova^{}, L.G.Proshina**

^{}Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины,
^{**}Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,
Институт медицинского образования НовГУ, ibogol@mail.ru*

Исследована структурная и функциональная организация ядер клеток молочной железы у нелактирующих и лактирующих крыс. Целью настоящей работы являлась иммунофлуоресцентная локализация некоторых компонентов ядерного метаболизма (хроматин-ремоделирующего белка ATRX, SR-белка SC35 и РНК-полимеразы I) в лактоцитах взрослых крыс, лактирующих в течение 2 нед. и после завершения лактации. Работа проведена с использованием непрямой иммунофлуоресцентной микроскопии. На препаратах, обработанных антителами к ATRX, относительная интенсивность флуоресценции ядер функционально активных лактоцитов была достоверно выше по сравнению с ядрами лактоцитов нелактирующей молочной железы. Аналогичная закономерность отмечена при использовании антител к фактору сплайсинга белку SC35. Средние значения относительной интенсивности меченая нуклеоплазмы при использовании антител к РНК-полимеразе I также были выше в ядрах клеток молочной железы в период лактации, однако достоверных различий между клетками различных экспериментальных групп по этому показателю не было выявлено. Таким образом, мы обнаружили, что изменения функционального состояния ядер клеток молочной железы сопровождаются изменениями ядерной локализации изученных белков в динамической системе «нуклеоплазма — ядерные домены». Полученные данные позволяют предположить, что изменения функциональной активности ядер лактоцитов могут также сопровождаться выраженными перестройками ядерных доменов, что делает актуальными дальнейшие исследования данной модели, в том числе на ультраструктурном уровне, для лучшего понимания структуры и функций ядер клеток молочной железы в лактационном цикле.

Ключевые слова: *лактоциты, ядро, ядерные домены, белок ATRX, SR-белок SC35, РНК-полимераза I*

The authors study the structural and functional organization of cell nuclei of the mammary gland was studied in non-lactating and lactating rats. The purpose of the present study was the localization of some components of nuclear metabolism (chromatin remodeling protein ATRX, SR protein SC35, and RNA polymerase I) using immunofluorescent microscopy in the lactocytes of adult rats with different lactation state: in animals lactating for 2 weeks, and after the finish of the lactation period. The research was performed with the use of indirect immunofluorescent microscopy. When specimens were treated with antibodies against ATRX protein, the relative intensity of the immunofluorescence of the nuclei in functioning lactocytes was reliably higher in comparison with the lactocytes nuclei of the non-lactating mammary gland. The similar pattern was registered when antibodies against splicing factor SC35 protein were applied. When antibodies against RNA polymerase I were used, the mean value of relative fluorescence intensity of the nucleoplasm marking was also higher in the cell nuclei of the mammary gland during the lactation; however, reliable differences of this index were not revealed between cells of different experimental groups of animals. Thus, we found that the changes of the functional state of cell nuclei of the mammary gland are accompanied with the changes of nuclear localization of analyzed proteins within the dynamic system 'the nucleoplasm — nuclear domains'. The obtained data also allow suggesting that the changes of the functional activity of the lactocyte nuclei can be accompanied with evident rearrangements of nuclear domains. That actualizes further studies of this model, including studies at the ultrastructural level for better understanding of the structure and functions of cell nuclei of the mammary gland during the lactation cycle.

Keywords: *lactocytes, nucleus, nuclear domains, ATRX protein, SR protein SC35, RNA polymerase I*

В настоящее время довольно много известно о физиологических и цитофизиологических механизмах лактации [1]. В то же время исследования лактационной функции с использованием современных методических возможностей сохраняют свою актуальность. Накопление новых данных о механизмах и закономерностях процессов секреции и выведения молока имеет высокую экономическую и социальную значимость. В частности, недостаток или отсутствие грудного вскармливания является одним из факторов повышенной заболеваемости молодняка сельскохозяйственных животных, что связано с недостаточным получением молозива и дефицитом защитных механизмов колострального иммунитета [2].

Следует отметить, что в большинстве современных исследований лактационной функции, проводимых на клеточном и субклеточном уровнях, внимание в большей степени уделяется особенностям строения и функционирования цитоплазматических структур [3]. Вопросы структурной организации ядер лактоцитов на различных стадиях развития молочной железы затрагиваются только в отдельных работах. При этом внимание исследователей, в первую очередь, концентрируется на вопросах динамики структурно-функциональной организации хроматина [4], тогда как динамика экстрахромосомных ядерных компартментов лактоцитов остается не исследованной.

Целью настоящей работы являлась иммунофлуоресцентная локализация некоторых компонентов ядерного метаболизма лактоцитов взрослых крыс с различным лактационным статусом — лактирующих в течение 2 нед. и после завершения лактации. С помощью непрямого иммунофлуоресцентного мечения проводили выявление следующих ядерных белков — хроматин-ремоделирующего белка ATRX, SR-белка SC35, являющегося маркером кластеров интерхроматиновых гранул, и РНК-полимеразы I. Распределение белка ATRX коррелирует со структурно-функциональным статусом хроматина [5]. Кластеры интерхроматиновых гранул, молекулярным маркером которых является белок SC35, представляют собой чрезвычайно динамичные универсальные ядерные домены экстрахромосомной области ядра, морфологические характеристики и

молекулярный состав которых отражают транскрипционную активность ядер [6]. РНК-полимераза I является ведущим фактором ядрышковой транскрипции, поэтому ее распределение и интенсивность мечения могут рассматриваться как информативные показатели функциональной активности этой ядерной органеллы [7]. Таким образом, нами впервые была предпринята попытка комплексного анализа структурно-функциональной организации ядер лактоцитов у лактирующих и нелактирующих крыс.

Материал и методика

У крыс вырезали пакеты молочных желёз и делали на предметных стеклах мазки-отпечатки, которые фиксировали 4%-ным параформальдегидом на PBS в течение 40 мин при комнатной температуре во влажной камере. Иммуноцитохимическое окрашивание образцов проводили по стандартной методике, включающей пермеабиллизацию клеток в 0.5%-ном растворе Тритона X100 на PBS в течение 10 мин при комнатной температуре и обработку 10%-ной фетальной сывороткой на PBS в течение 10 мин для предупреждения неспецифического связывания антител.

В качестве первичных антител использовали неразведённые моноклональные антитела к SR-белку SC35 в концентрации 20 мг/мл [8] и к РНК-полимеразе I в разведении 1:100 [9], а также поликлональные антитела к белку ATRX в разведении 1:50 (SantaCruzInc). В качестве вторичных антител использовали конъюгированные с FITC козы антитела (MolecularProbes) к иммуноглобулинам мыши в разведении 1:128, к иммуноглобулинам кролика в разведении 1:50, к иммуноглобулинам человека в разведении 1:100 соответственно. Как с первичными, так и со вторичными антителами препараты инкубировали в течение 75 мин при комнатной температуре. Препараты заключали в среду Vectashield с добавлением DAPI (0.25 мкг/мл) и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Axioskop (Karl Zeiss).

Определение относительной интенсивности флуоресценции проводили на цифровых изображениях с помощью программы ImageJ.

Относительная интенсивность флуоресценции нуклеоплазмы лактоцитов с различным функциональным статусом после иммуномечения

	Антитела к белку ATRX	Антитела к белку SC 35	Антитела к РНК-полимеразе I
Ядра клеток молочной железы в период лактации	5,580 ± 0,141*	7,093 ± 5,406	4,530 ± 5,761
Ядра клеток молочной железы после завершения лактации	3,810 ± 1,052 *	2,558 ± 1,564	1,812 ± 0,404

* различия между группами достоверны для $p \leq 0,05$

Результаты и обсуждение

Ядра лактоцитов в обеих группах имели правильную округло-овальную форму, соотношение большего диаметра ядер к меньшему в среднем составляло $1,3 \pm 0,15$ мкм.

В ядрах функционально неактивных лактоцитов распределение хроматина по результатам окраски DAPI в целом имеет диффузный характер, однако в центральной части ядра можно видеть выраженные глыбки гетерохроматина (в среднем от 1 до 3 на ядро). Кроме того, зоны гетерохроматина локализуются по периферии ядра. Для функционально активных лактоцитов характерно диффузное распределение хроматина, со слабо выраженными скоплениями гетерохроматина.

При использовании антител к хроматин-ремоделирующему белку ATRX наблюдаемый паттерн флуоресцентного мечения складывается из диффузного мечения нуклеоплазмы и большого числа зон более интенсивной флуоресценции, хорошо видимых на этом фоне. Следует обратить внимание, что диффузное свечение нуклеоплазмы в большей степени выражено в ядрах лактирующих клеток молочной железы. Это подтверждается и данными фотометрического анализа. Относительная интенсивность флуоресцентного мечения антителами к белку ATRX достоверно выше в ядрах функционально активных лактоцитов, чем в ядрах лактоцитов, полученных из нелактирующей молочной железы ($5,6 \pm 0,1$ и $3,8 \pm 1,1$, соответственно). Наблюдаемое перераспределение белка ATRX в ядрах лактирующих клеток можно объяснить полифункциональностью этого белка, который, по последним данным, не только входит в состав конститутивного гетерохроматина, но и, по-видимому, выполняет функцию транскрипционного фактора [5].

Распределение флуоресцентного мечения ядер лактоцитов после использования антител к фактору сплайсинга белку SC35 характеризуется аналогичной закономерностью. Области более яркой флуоресценции, соответствующие кластерам интерхроматиновых гранул, или speckles, наблюдаются в обеих группах ядер. В то же время в ядрах секреторных клеток лактирующей молочной железы более сильно выражено диффузное свечение нуклеоплазмы. Визуальные на-

блюдения подтверждаются данными фотометрического анализа (табл.). Выявленные различия в распределении белка SC35 в ядрах лактоцитов с разным функциональным статусом полностью соответствуют современным представлениям о внутриядерной динамике факторов сплайсинга, которые при активации транскрипционной активности ядра перемещаются из депонирующих их ядерных доменов к местам транскрипции [10].

Значительные различия между паттернами иммунофлуоресцентного мечения ядер функционально активных и неактивных лактоцитов наблюдаются при использовании антител к РНК-полимеразе I. В ядрах функционально неактивных лактоцитов РНК-полимераза I распределена по всему объему ядра. При этом на фоне диффузного мечения нуклеоплазмы наблюдаются беспорядочно разбросанные фокусы более яркой флуоресценции. В ядрах лактирующих клеток подобные светящиеся точки не выявляются. На фоне сохраняющегося диффузного свечения нуклеоплазмы отчетливо видны несколько крупных зон флуоресцентного мечения, которые, по-видимому, соответствуют участкам активного синтеза рРНК. Интересно, что интенсивность мечения нуклеоплазмы при использовании антител к РНК-полимеразе I, как и в случае описанных выше антител, выше в ядрах клеток молочной железы в период лактации (табл.). Это наблюдение сложно интерпретировать на основании проведенных исследований.

Возможно, повышение концентрации РНК-полимеразы I в свободном состоянии в нуклеоплазме отражает процессы интенсивного перераспределения факторов ядрышковой транскрипции, характерные для функционально активных клеток.

Таким образом, изменения функциональной активности лактоцитов крыс сопровождаются внутриядерным перераспределением таких значимых компонентов ядерного метаболизма, как хроматин-ремоделирующий белок ATRX, фактор сплайсинга белок SC35 и РНК-полимераза I. Полученные данные позволяют предположить, что изменение функциональной активности ядер лактоцитов сопровождается также выраженными перестройками в системе ядерных доменов, что делает актуальными дальнейшие исследования данной модели, в том числе на ультраструктурном уровне.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы «Молекулярная и клеточная биология» Российской академии наук.

1. Грачев И.И. Клеточные механизмы регуляции секреции молока. М.: Элиста, 1995. С. 51-53.
2. Абрамов С.С. Анатомо-физиологические особенности растущего организма. М., Агропромиздат, 1990. С. 23-24.
3. Грачев И.И. Современные достижения физиологии и биохимии лактации. Л.: Наука, 1991. С. 40-42.
4. Kress C. et al. Epigenetic modifications in 3D: nuclear organization of the differentiating mammary epithelial cell // Mammary Gland Biol. Neoplasia. 2010. Vol. 15. P. 73-83.
5. Ratnakumar K., Bernstein E. ATRX. The case of a peculiar chromatin remodeler // Epigenetics. 2013. Vol. 8. P. 3-9.
6. Spector D.L., Lamond A.I. Nuclear speckles // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2011. Vol. 3. no. 2, Article ID a000646.
7. Sirri V. et al. Nucleolus: the fascinating nuclear body // Histochem. Cell Biol. 2008. Vol. 129. P. 13-31.
8. Fu X.-D., Maniatis T. Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized to discrete regions in the nucleus // Nature. 1990. Vol. 343. P. 437-441.
9. Ochs R.L. et al. Coiled bodies in the nucleolus of breast cancer cells // J. Cell Sci. 1994. Vol. 107. P. 385-399.
10. Zeng C. et al. Dynamic relocation of transcription and splicing factors dependent upon transcriptional activity // EMBO Journal. 1997. Vol. 16. P. 1401-1412.

References

1. Grachev I.I. Kletochnye mekhanizmy regulya-tsii sekretsii moloka [Cell mechanisms of the lactation regulation]. Moscow, Elista Publ., 1995, pp. 51-53.
2. Abramov S.S. Anatomo-fiziologicheskie osobennosti rastushchego organizma [Anatomical and physiological peculiarities of a crescent organism]. Moscow, Agropromizdat Publ., 1990, pp. 23-24.
3. Grachev I.I. Sovremennye dostizheniya fi-ziologii i biokhimii laktatsii [Modern achievements of lactation physiology and biochemistry]. Leningrad, Nauka Publ., 1991. pp. 40-42.
4. Kress C. et al. Epigenetic modifications in 3D: nuclear organization of the differentiating mammary epithelial cell. Mammary Gland Biol. Neoplasia, 2010, vol. 15, pp. 73-83.
5. Ratnakumar K., Bernstein E. ATRX. The case of a peculiar chromatin remodeler. Epigenetics, 2013, vol. 8. pp. 3-9.
6. Spector D.L., Lamond A.I. Nuclear speckles. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2011, vol. 3, no. 2, Article ID a000646.
7. Sirri V. et al. Nucleolus: the fascinating nuclear body. Histochem. Cell Biol, 2008, vol. 129, pp. 13-31.
8. Fu X.-D., Maniatis T. Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized to discrete regions in the nucleus. Nature, 1990, vol. 343, pp. 437-441.
9. Ochs R.L. et al. Coiled bodies in the nucleolus of breast cancer cells. J. Cell Sci., 1994, vol. 107, pp. 385-399.
10. Zeng C. et al. Dynamic relocation of transcription and splicing factors dependent upon transcriptional activity. EMBO Journal, 1997, vol. 16, pp. 1401-1412.