

ВЗАИМНОЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЕ РАСПОЛОЖЕНИЕ
КОМПОНЕНТОВ ЯДРЫШКА И ЯДРЫШКОВОГО ХРОМАТИНА
В СОМАТИЧЕСКИХ ЯДРАХ ИНФУЗОРИИ *Didinium nasutum*

© 2012 г. О. Г. Леонова¹, Б. П. Караджян², Ю. Ф. Ивлев³, Ю. Л. Иванова¹, В. И. Попенко^{1*}

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 199991

²Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, 194064

³Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, 119071

Поступила в редакцию 21.04.2011 г.

Принята к печати 24.06.2011 г.

Согласно данным компьютерного моделирования интерфазные ядрышки инфузории *Didinium nasutum* представляют собой сложные сетчатые структуры, в которых фибриллярный компонент в форме трабекул или ламелл располагается по периферии, а гранулярный — в центральной части ядрышка. Роль ядрышковых организаторов у *D. nasutum* играют хроматиновые тельца, связанные с ядрышками. В представленной работе на 3D моделях изучено расположение всех телец хроматина, которые по морфологическим критериям могли соответствовать ядрышковым организаторам. Показано, что все такие тельца располагаются вне ядрышек, по периферии фибриллярной зоны. Даже те тельца, которые на одиночных срезах выглядели полностью окруженными фибриллярным компонентом ядрышка, в действительности находятся в углублениях и впадинах ядрышка при соответствующем прохождении плоскости среза. Это служит прямым доказательством того, что в ядрышках *D. nasutum* вектор процессинга РНК направлен от периферии к центру, где расположен гранулярный компонент. Анализ распределения телец ядрышкового хроматина в разных частях ядрышковых сетей позволяет заключить, что активность разных частей сложных интерфазных сетчатых ядрышек *D. nasutum* примерно одинакова.

Ключевые слова: трехмерная реконструкция, структура ядрышек, инфузории, макронуклеус, серийные ультратонкие срезы, электронная микроскопия.

STUDY OF THE POSITIONAL RELATIONSHIP OF NUCLEOLAR CHROMATIN AND NUCLEOLAR COMPARTMENTS IN SOMATIC NUCLEI OF THE CILIATE *Didinium nasutum*, by O. G. Leonova¹, B. P. Karajan², Y. F. Ivlev³, J. L. Ivanova¹, V. I. Popenko^{1*} (¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia; *e-mail: popenko@eimb.ru; ²Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia; ³Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia). We showed earlier that nucleoli in interphase ciliates *Didinium nasutum*, appearing on single ultrathin sections as individual structures, actually are parts of more complex network-like structures in which fibrillar component is located on periphery, and granular — in the central part of a nucleolus. It is known, that nucleolar organizers in *D. nasutum* are represented by chromatin bodies connected with nucleoli. In this work we used 3D reconstruction on the basis of serial ultrathin sections to study localization of chromatin bodies which by morphological criteria might correspond to nucleolar organizers. Our data showed, that all such chromatin bodies settled down outside of nucleoli, near the periphery of fibrillar component. Even those chromatin bodies which on single sections looked completely surrounded by fibrillar nucleolar component, actually settled down in fibrillar component cavities open to nucleoplasm. Analysis of distribution of nucleolar chromatin bodies allowed us to conclude that activity in different parts of interphase complex network-like nucleoli of *D. nasutum* is approximately the same.

Keywords: 3D reconstruction, serial ultrathin sections, electron microscopy, nucleoli, ciliata, macronucleus.

Ядрышко — хорошо изученная структура эукариотического ядра, в которой происходят синтез и процессинг рРНК, а также сборка субъединиц рибосом. Структурная организация и функциональ-

ная активность ядрышка меняется на разных стадиях клеточного цикла и зависит от действия внешних факторов. Обычно клеточное ядро высших эукариот содержит от одного до пяти ядрышек диаметром 0.5–5 мкм [1–3]. Общее число ядрышек в клетках в интерфазе ограничено числом

* Эл. почта: popenko@eimb.ru

ядрышковых организаторов. Однако в подавляющем большинстве исследованных типов клеток число ядрышек оказывается меньше числа ядрышковых организаторов, что связано со способностью ядрышек к слиянию, а также с тем, что в интерфазе не все ядрышковые организаторы могут быть активны (см. обзор [4])

В активных интерфазных ядрышках методами электронной микроскопии выявляются фибриллярные центры, плотный фибриллярный компонент, гранулярный компонент, ядрышковые вакуоли, а также ассоциированный с ядрышком хроматин [5]. Фибриллярные центры эукариотических ядрышек на ультратонких срезах имеют вид округлых скоплений тонких фибрилл толщиной около 7 нм. По их периферии располагается плотный фибриллярный компонент, электронная плотность которого больше, чем у материала фибриллярных центров. Одиночные фибриллярные центры или их группы, окруженные общим слоем плотного фибриллярного компонента, предложено называть фибриллярными комплексами [6, 7]. Считается, что фибриллярные комплексы соответствуют ядрышковым организаторам индивидуальных хромосом, так как между числом тех и других структур наблюдается хорошее соответствие [6, 7]. Гранулярный компонент ядрышек образован гранулами диаметром около 20 нм.

В настоящее время общепринята точка зрения, согласно которой транскрипция рибосомных генов происходит на границе фибриллярного и плотного фибриллярного компонента, в районе плотного фибриллярного компонента осуществляется созревание транскриптов пре-рРНК и деградация ее спейсерных участков, а в гранулярном компартменте протекают поздние стадии сборки рибосомных частиц перед экспортом их в нуклеоплазму и затем в цитоплазму [4, 8–10]. Такая ультраструктура ядрышек предполагает, что процессинг рРНК в них происходит в направлении от центра к периферии.

В клетках некоторых эукариот ядрышки образованы внехромосомными копиями рибосомных генов. Например, ооциты амфибий *Xenopus* sp. содержат не менее 2 млн. внехромосомных генов рРНК, распределенных по нескольким тысячам амплифицированных ядрышек [11, 12]. Однако электронно-микроскопические исследования, проведенные на клетках разных организмов, показали, что общие принципы структурной организации ядрышек одинаковы у большинства эукариот, включая животных, растения, амплифицированные ядрышки ооцитов *Xenopus* и дрожжей [13].

В отличие от клеток высших эукариот, клетки инфузорий содержат одновременно ядра двух типов: неактивные генеративные соматические ядра — микронуклеусы, и транскрипционно-активные высокополиплоидные соматические ядра —

макронуклеусы, обеспечивающие жизнедеятельность инфузорий в течение вегетативного цикла [14]. Геномы макронуклеусов представлены наборами относительно коротких, по сравнению с высшими эукариотами, молекул ДНК. У видов инфузорий с генным размером ДНК (“gene-sized”) размер молекул ДНК макронуклеуса составляет 5–20 т.п.н., а у видов с субхромосомным размером ДНК — несколько сотен т.п.н. [15, 16]. Благодаря этому ядра инфузорий представляют собой удобный объект для изучения того, в какой степени организация ядра в целом и отдельных его компонентов зависят от размера молекул ДНК генома.

Основная часть хроматина интерфазного макронуклеуса у большинства изученных инфузорий организована в виде глыбок размером от 50 до 200 нм, хотя у некоторых видов, например у *Stylochichia lemnae* (генный размер ДНК), хроматин может иметь вид толстых (0.1–0.2 мкм) тяжей [14–17]. В то же время по биохимической организации хроматин макронуклеусов и ядер высших эукариот очень сходен [16, 18]. Ядрышки инфузорий находятся в макронуклеусах, они образованы многочисленными внехромосомными копиями ДНК, содержащей рибосомные гены. Так, в макронуклеусе *Thetrahymena thermophila* находятся 100–500 ядрышек и около 9000 внехромосомных копий уникальных палиндромных хромосом, кодирующих рРНК [19–21].

На ультраструктурном уровне в ядрышках большинства инфузорий, как и в ядрышках высших эукариот, выявляются три компонента: гранулярный и фибриллярный, а также ассоциированный с ядрышками хроматин, содержащий рДНК [14–16]. Однако данные, полученные при изучении инфузории *S. lemnae* с использованием конфокальной микроскопии [22], показывают, что ядрышки инфузорий могут отличаться от ядрышек высших эукариот как по пространственной организации, так и по направлению вектора процессинга рРНК в них. Согласно [22], в макронуклеусе *S. lemnae* синтез рРНК происходит на хроматине, расположенном по периферии ядрышковых структур, а процессинг — по мере продвижения рРНК в центральную, свободную от хроматина, область.

Ранее мы изучали пространственное расположение фибриллярного и гранулярного компонентов ядрышек *D. nasutum* и предположили, что ситуация, когда процессинг рРНК происходит в направлении от периферии ядрышка к его центральной части, может наблюдаться и у инфузорий с субхромосомным размером ДНК макронуклеуса [23]. Известно, что роль ядрышковых организаторов у инфузорий играют хроматиновые тельца, расположенные внутри или на периферии ядрышек [14]. Цель данной работы состоя-

ла в изучении на 3D моделях расположения всех телец хроматина, которые по морфологическим критериям могли соответствовать ядрышковым организаторам, относительно фибриллярного и гранулярного компонентов ядрышек *D. nasutum*. Полученные данные показывают, что все такие тельца располагаются вне ядрышек по периферии фибриллярной зоны. Кроме того, 3D модели позволили сравнить распределение телец ядрышкового хроматина в разных частях больших сложных сетчатых ядрышек и сделать вывод об их сравнительной активности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Инфузории *D. nasutum*, полученные из Института цитологии РАН (Санкт-Петербург), культивировали при комнатной температуре на кипяченой водопроводной воде. В качестве корма использовали инфузорий *Paramecium caudatum*, культивируемых на салатной среде, как описано в [23]. Для получения голодных особей инфузорий *D. nasutum* выдерживали в воде без корма в течение 30 ч.

Клетки фиксировали 2.5%-ным раствором глутаральдегида на 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.5) в течение 1 ч при комнатной температуре, затем клетки дегидратировали в растворах этанола возрастающей концентрации и заключали в смолу эпон-аралдит по стандартной методике. Молодые цисты (возрастом до 16 ч) фиксировали и заключали в эпон-аралдит как описано ранее [24, 25].

Срезы толщиной 50–70 нм получали на ультратоме LKB III (“LKB”, Швеция) и контрастировали ацетатом уранила и цитратом свинца по стандартной методике. Препараты просматривали в электронном микроскопе JEM-100CX (“JEOL”, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Негативы (увеличение $\times 10000$) сканировали с конечным разрешением 480 пикселей на 1 мкм среза.

Трехмерную реконструкцию проводили на серийных срезах (20–30 срезов, толщина 50–70 нм) с помощью пакета программ STEREM, разработанного для работы в программно-ориентированной среде MatlabTM версии 5.3 и выше [26, 27].

Негативы с увеличением $\times 10000$ сканировали на сканере EPSON Perfection 3200 (Япония) с разрешением 1200 пикселей на дюйм (т.е. 4.8 пикселей на 10 нм исходного образца). Дальнейшие операции проводили с использованием графического редактора Adobe PhotoshopTM и инструментов разработанного нами комплекта программ Sterm (доступен по адресу yuvertb@sevin.ru) в автоматическом и ручном режимах. Объекты выделяли вручную. Особое внимание уделяли участкам изображения с неровным освещением или с малым контрастом, чтобы исключить артефакт-

ное смыкание контуров, принадлежащих разным объектам. Изображения выравнивали с помощью реперных точек на типичных, хорошо идентифицируемых на ультратонких срезах объектах. Трассировку (построение двумерных векторных изображений контуров объектов) проводили в автоматическом режиме в программе Sterm. Контурам, принадлежащим разным реконструируемым объектам, присваивали названия, благодаря которым в случае необходимости возможно их поименное выделение. Далее на основе двумерных контуров объектов создавали трехмерные модели их поверхностей. Для построения изоповерхностей объектов в программе создавали промежуточный трехмерный массив, слои которого представляют собой бинарные изображения соответствующих срезов, полученные путем повторного преобразования в растровую форму предварительно выровненных векторных изображений. Границами объектов считались изоповерхности, которые можно было построить внутри данного массива. Процедуры сглаживания обычно не использовали или применяли в минимальной степени, чтобы избежать искажения реконструированных моделей.

Максимальные объемы реконструированных участков макронуклеусов составляли ~ 200 , ~ 400 , 65 мкм^3 для голодных, сытых инфузорий и цист соответственно. При построении моделей учитывали только структуры размером более 50 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Структурная организация и функциональная активность ядрышка изменяются на разных стадиях клеточного цикла, а также зависят от действия внешних факторов. Известно, что у инфузорий активность ядрышек снижается при голодании, поэтому исследования проводили на “сытых” интерфазных инфузориях *D. nasutum* и на интерфазных инфузориях после 30-часового голодания. На рис. 1а представлен ультратонкий срез макронуклеуса сытой инфузории *D. nasutum* на стадии интерфазы. В соответствии с данными, полученными ранее [28], ядрышки *D. nasutum* имеют инвертированное расположение компонентов, а именно, фибриллярный материал образует сгустки, или трабекулы, на периферии ядрышка, а гранулярный материал более или менее равномерно заполняет внутреннюю часть. Хроматиновые тельца имеют размер 0.05–0.1 мкм и распределены по всему пространству макронуклеуса. На основе анализа ультратонких срезов все хроматиновые тельца, которые по морфологическим критериям могли претендовать на роль ядрышковых организаторов, были условно разделены на два типа (рис. 1б–г). К первому были отнесены тельца, локализованные внутри ядрышек – хроматиновые тельца типа I (рис. 1б). Ко второму типу (хроматиновые тельца типа II) –

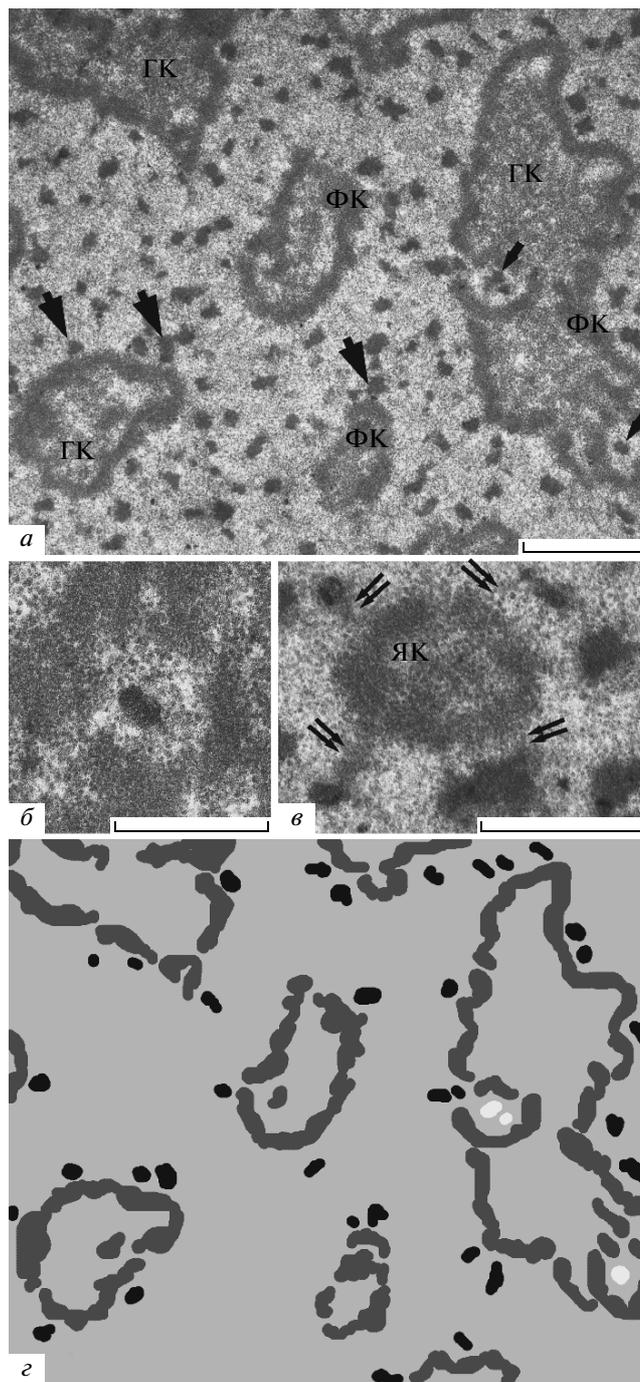
Рис. 1. *a* — Ультратонкий срез фрагмента макронуклеуса “сытой” инфузории *D. nasutum* на стадии интерфазы. Гранулярный компонент ядрышек располагается в центральной части ядрышка, а фибриллярный компонент — по периферии, образуя сгустки, или трабекулы. Хроматиновые тельца ядрышкового хроматина могут располагаться “внутри” ядрышек (тип I, маленькие стрелки), вблизи ядрышек, при этом на срезах можно проследить фибриллы, соединяющие хроматиновые тельца с ядрышками (тип II, большие стрелки). *б, в* — Фрагменты срезов в большем увеличении, показывающие хроматиновые тельца типа I и II соответственно. Двойными стрелками показаны тяжи, связывающие хроматиновые тельца с фибриллярным компонентом. *г* — Одиночный срез “сытой” инфузории *D. nasutum*, подготовленный для трехмерной реконструкции. Белым, черным и серым выделены хроматиновые тельца типа I, типа II и фибриллярный компонент ядрышек соответственно. Размеры по осям указаны в нм. ЯК — ядрышко, ГК — гранулярный компонент, ФК — фибриллярный компонент. Масштабный отрезок: *a* — 1 мкм; *б, в* — 0.5 мкм.

тельца, расположенные на периферии ядрышек, соединенные тяжами или нитями хроматина с фибриллярным компонентом (рис. 1*в*, двойные стрелки).

После голодания в течение 30 ч ядрышки увеличиваются в размерах, но число их уменьшается (рис. 2*а*). В гранулярном компоненте ядрышек образуются большие полости, содержащийся в них тонкофибриллярный компонент, как показано ранее, имеет нерибонуклеопроteidную природу [23]. Внутри вакуолей выявляются РНП-гранулы, соответствующие по размеру гранулам гранулярного компонента. Подобные гранулы наблюдаются также в кариоплазме. Хроматиновые тельца внутри ядрышек голодных клеток (тельца типа I) не выявлены, хотя часть телец, расположенных рядом с ядрышками, сохраняют связь с фибриллярным компонентом. На рис. 2*б* показан один из серийных срезов, подготовленный для трехмерной реконструкции, на котором выделен фибриллярный компонент ядрышка и связанные с ним хроматиновые тельца типа II.

Для сравнения на рис. 3 приведен фрагмент макронуклеуса цисты. В цистах активность ядра минимальна [14]. Хроматиновые тельца сливаются, образуя фибриллы, видимый размер которых достигает 1.5 мкм. Число ядрышек в макронуклеусе и их размер резко уменьшаются. Размер ядрышек составляет от 0.15 до 0.9 мкм. Маленькие ядрышки (~0.2 мкм) состоят только из гранулярного компонента. В ядрышках большего размера (0.6–0.9 мкм, слева внизу на рис. 3) фибриллярный и гранулярный компоненты сегрегированы. Ни тельца внутри ядрышек, ни связанные с ядрышками хроматиновые тельца не выявляются.

Таким образом, по мере снижения активности ядрышек уменьшается число телец ядрышкового хроматина (типа I и II) рядом с ними. Для прове-



дения точного количественного анализа построены 3D модели ядрышек из сытых и голодных инфузорий *D. nasutum* (рис. 4, рис. 5). (Модели ядрышек цист не показаны, так как в цистах отсутствуют хроматиновые тельца обоих типов, а модели гранулярного и фибриллярного компонентов приведены в [23]). Интерфазные ядрышки *D. nasutum* имеют вид сложных сетчатых структур, периферия которых образована фибриллярным, а центральная часть — гранулярным компонентом. Чтобы не загромождать рисунок, на моделях

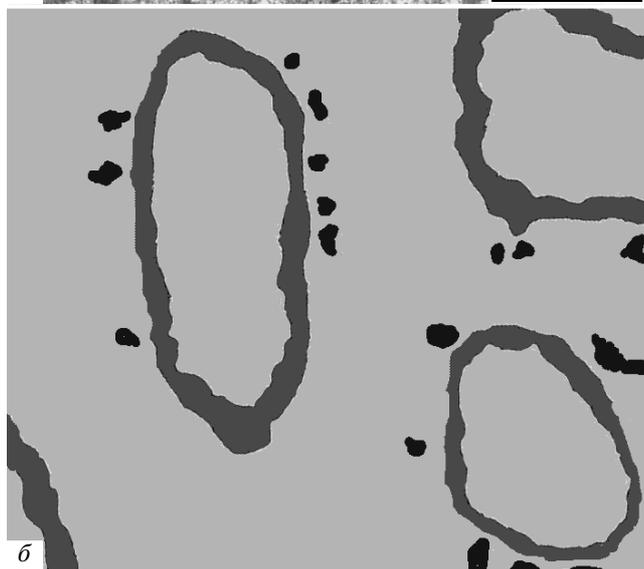
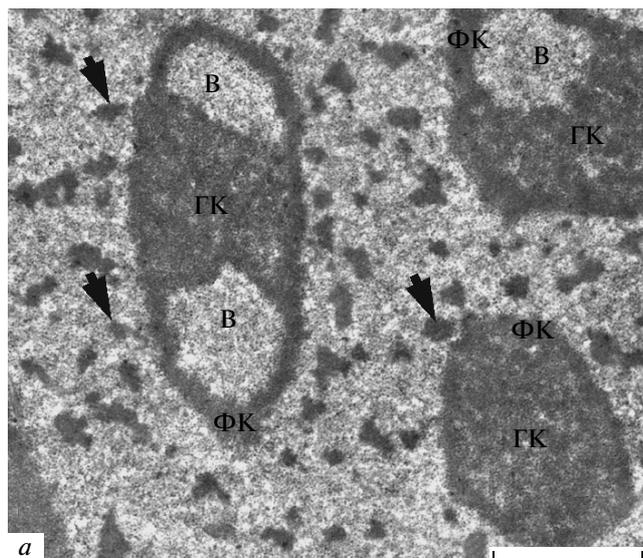


Рис. 2. Фрагмент ультратонкого среза макронуклеуса “голодной” инфузории *D. nasutum* на стадии интерфазы (а) и одиночный срез “голодной” инфузории *D. nasutum*, подготовленный для трехмерной реконструкции (б). Хроматиновые тельца внутри ядрышек (типа I) отсутствуют. Черным, темно-серым и светло-серым выделены хроматиновые тельца типа II, фибриллярный и гранулярный компоненты ядрышек соответственно. Обозначения: ГК – гранулярный компонент; ФК – фибриллярный компонент; В – вакуоли; большие стрелки – хроматиновые тельца типа II. Масштабный отрезок – 1 мкм.

оставлены только фибриллярный компонент ядрышек и ядрышковые организаторы – хроматиновые тельца типа I и II. Объем фибриллярного компонента в самых больших реконструированных ядрышках равен 38.98 и 21.07 мкм³, в сытых и голодных инфузориях соответственно.

Первым неожиданным результатом оказалось то, что все без исключения хроматиновые тельца

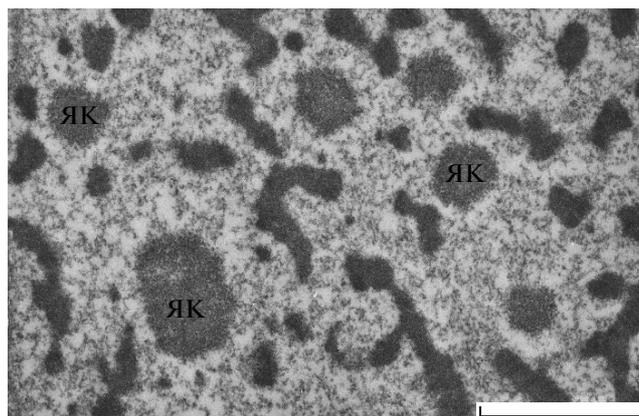


Рис. 3. Ультратонкий срез фрагмента макронуклеуса цисты *D. nasutum*. Число ядрышек (ЯК) и их размер уменьшаются. Хроматиновые тельца соединяются в фибриллы. Тельца, связанные с ядрышками, отсутствуют. Масштабный отрезок – 1 мкм.

располагаются снаружи ядрышек. Даже хроматиновые тельца типа I, которые на одиночных срезах казались полностью окруженными фибриллярным компонентом ядрышка (рис. 1а, б), в действительности находятся снаружи ядрышка, располагаясь во впадинах или полостях, которые образует фибриллярный компонент.

Для примера на рис. 6а приведен укрупненный фрагмент 3D модели интерфазного ядрышка в “сытой” инфузории *D. nasutum*, показывающий реальное расположение одного из хроматиновых телец типа I, которое на одиночном срезе выглядит находящимся внутри ядрышка (отмечено звездочкой на рис. 6г–е). Серия срезов, на основе которых реконструирован фрагмент, показана на рис. 6б–ж. На рис. 6а видно, что в действительности это хроматиновое тельце располагается в полости, соединенной с нуклеоплазмой.

Таким образом, пространственное расположение хроматиновых телец, фибриллярного и гранулярного компонентов соответствует тому, что процессинг рРНК происходит по направлению от периферии к центральной части ядрышка.

Чтобы сопоставить число ядрышковых организаторов (хроматиновых телец типа I и II) мы определили объем фибриллярной зоны в реконструированных ядрышках и сравнили число хроматиновых телец, приходящихся на 1 мкм³ объема фибриллярного компонента ядрышек сытых и голодных инфузорий. Оказалось, что у голодных инфузорий число хроматиновых телец на 1 мкм³ фибриллярного компонента снижено по сравнению с сытыми инфузориями (25.48 против 62.4 на мкм³ соответственно), что хорошо коррелирует с изменениями функционального состояния клетки.

Полученные 3D модели позволили сравнить эти параметры для целого ядрышка и его отдель-

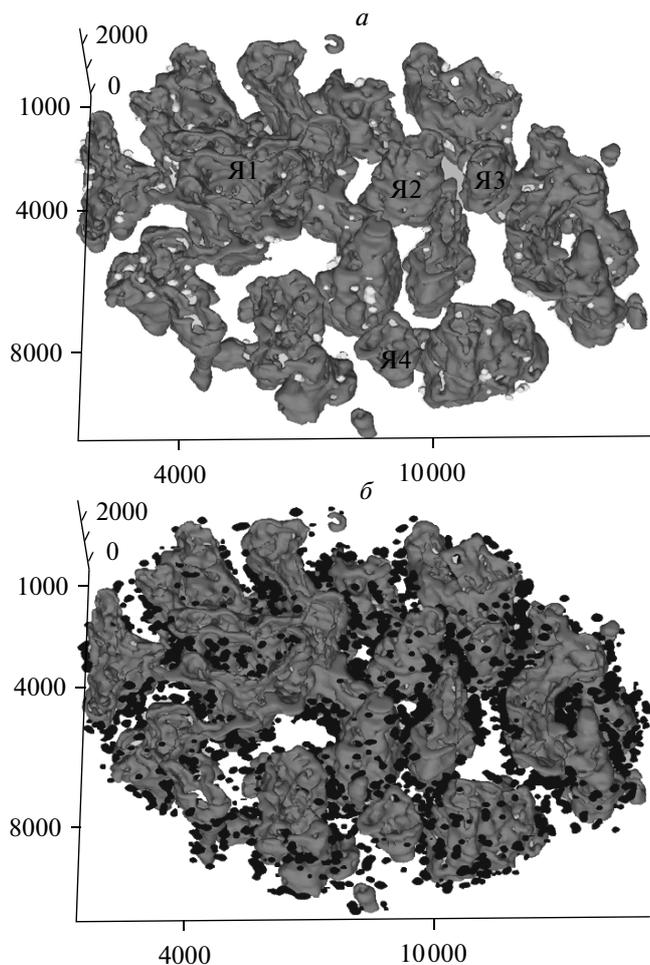


Рис. 4. Трехмерная реконструкция ядрышек и хроматиновых телец в “сытых” инфузориях *D. nasutum*. Все хроматиновые тельца, которые по морфологическим критериям могут соответствовать ядрышковым организаторам, располагаются снаружи ядрышек. *a* – Показан фибриллярный компонент и хроматиновые тельца типа I; *б* – фибриллярный компонент и хроматиновые тельца типа II. Число хроматиновых телец типа I и II на 1 мкм³ объема фибриллярного компонента этого ядрышка составляет 62.4, а в отдельных частях, обозначенных Я1, Я2, Я3 и Я4 – 59.3, 64.4, 48.48 и 53.65 соответственно. Размеры по осям указаны в нм.

ных частей. Оказалось, что в среднем число активных ядрышковых организаторов в разных частях ядрышковых сетей примерно одинаково и, соответственно, примерно одинакова активность разных частей таких сложных сетчатых ядрышек. У сытых интерфазных инфузорий среднее число хроматиновых телец типа I и II на 1 мкм³ объема фибриллярного компонента составляло 62.4, а в четырех отдельных цепях – от 48.48 до 64.4 на мкм³ (рис. 4*a*). Аналогичной была картина и в ядрышках голодных интерфазных клеток *D. nasutum*. Среднее число телец типа I и II на 1 мкм³ в яд-

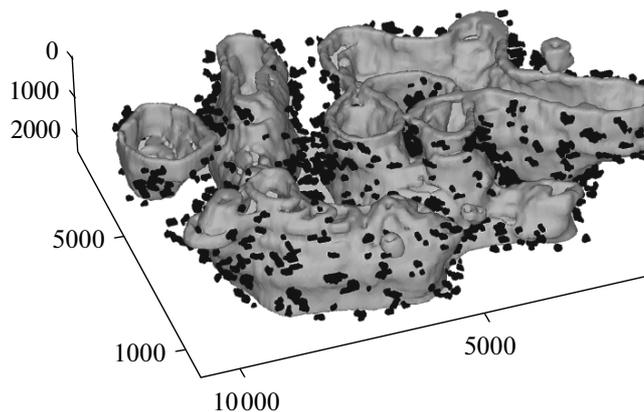


Рис. 5. Трехмерная реконструкция ядрышек и хроматиновых телец в “голодных” инфузориях *D. nasutum*. Показаны фибриллярный компонент и хроматиновые тельца типа II. Размеры по осям указаны в нм.

рышке, показанном на рис. 5, составляло 25.48, а в отдельных его частях от 21.28 до 28.31.

Таким образом, уменьшение числа околядрышковых хроматиновых телец при снижении клеточной активности (в голодных инфузориях *D. nasutum*) происходит одновременно во всех частях сложных ядрышек.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Компьютерное моделирование на основе серийных ультратонких срезов является эффективным подходом к изучению пространственной организации клеточных структур [26, 27]. С помощью этого подхода показано, что в интерфазных ядрышках инфузории *D. nasutum* структуры, выглядящие на одиночных ультратонких срезах как обособленные ядрышки, в действительности входят в состав более сложных сетчатых ядрышковых структур, в которых фибриллярный компонент в форме трабекул или ламелл располагается по периферии, а гранулярный – в центральной части ядрышка [23].

Известно, что ядрышковые организаторы у *D. nasutum* имеют вид хроматиновых телец [14, 24]. В то же время данные оптической микроскопии показывают, что часть рибосомных генов макронуклеуса неактивна, так как находится в хроматиновых тельцах, не связанных с ядрышками [29]. Поэтому в нашей работе мы на 3D моделях изучили расположение всех телец хроматина, которые по морфологическим критериям могли соответствовать ядрышковым организаторам. Показано, что все такие тельца располагаются вне ядрышек, по периферии фибриллярной зоны (рис. 4, рис. 5, рис. 6). Даже те тельца, которые на одиночных срезах выглядели полностью окруженными фибриллярным компонентом ядрышка, в действительности располагаются в его углублении

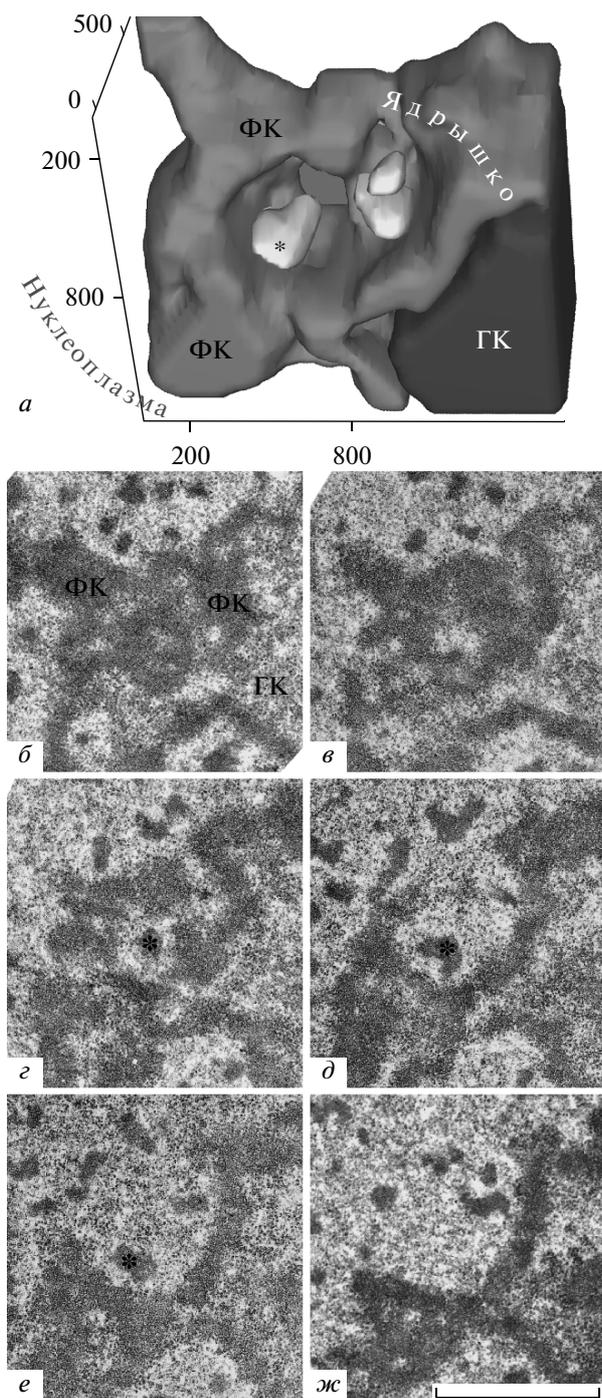


Рис. 6. Фрагмент 3D модели интерфазного ядрышка в “сытой” инфузории *D. nasutum* (а) и серия срезов, на основе которых реконструирован фрагмент (структуры ядрышка – в правой нижней части, нуклеоплазма – в верхней левой части срезов) (б–ж). а – Белым, серым и черным выделены хроматиновые тельца типа I, фибриллярный и гранулярный компоненты ядрышек соответственно. Размеры по осям – в нм. Хроматиновое тельце, отмеченное звездочкой, на срезе з выглядит находящимся внутри ядрышка. В действительности оно располагается вне ядрышкового компонента, на границе нуклеоплазмы и фибриллярного компонента. ГК – гранулярный компонент; ФК – фибриллярный компонент. Масштабный отрезок – 1 мкм.

ях и впадинах на границе с нуклеоплазмой (рис. 4а, рис. 6). Это означает, что синтез рРНК происходит на периферии ядрышек *D. nasutum*, а процессинг рРНК и формирование прерибосомных частиц – по мере перемещения рРНК к центру ядрышка, т.е. вектор процессинга рРНК направлен не так, как в “классических” ядрышках высших эукариот, а извне – от периферии ядрышка к его центру, где расположен гранулярный компонент.

Ранее с помощью конфокальной микроскопии было показано, что ядрышки с подобным “неканоническим” направлением вектора процессинга рРНК есть в макронуклеусе *S. lemnae* [22], геном которой представлен молекулами ДНК генного (0.4–20 т.п.н.) размера. Наши данные доказывают, что такая же ситуация наблюдается и в макронуклеусах инфузорий с субхромосомным размером ДНК.

Число активных копий рДНК у инфузорий зависит от условий питания и других внешних факторов [20]. Это согласуется с нашими данными о том, что у голодных интерфазных инфузорий *D. nasutum* число хромосомных телец околядрышкового хроматина меньше, чем в сытых интерфазных клетках, и они практически отсутствуют в цистах. В среднем число околядрышковых телец хроматина на единицу объема (мкм^3) фибриллярного компонента снижается более чем вдвое – с 62.4 до 25.48, что хорошо коррелирует с функциональным состоянием ядрышка.

Однако в настоящее время нельзя точно сказать, все ли околядрышковые хроматиновые тельца содержат рРНК. Дать точный ответ на этот вопрос сложно, так как использование гибридизации *in situ* для локализации рРНК на серийных ультратонких срезах связано с большими методическими трудностями, а конфокальная микроскопия не обеспечивает достаточного разрешения. Классический подход к выявлению активных ядрышковых организаторов у высших эукариот – окрашивание нитратом серебра. Применение этого подхода к инфузориям *Paramecium putrinum* показало, что окрашиваются хроматиновые тельца, расположенные по периферии ядрышек, что соответствует нашим результатам [29]. Однако при этом окрашивалась и часть телец, расположенных в нуклеоплазме. При гибридизации *in situ* с рДНК с помощью конфокальной микроскопии в интерфазе метка также обнаруживалась в хроматиновых тельцах по всему объему ядра [21]. Таким образом, часть телец, содержащих рибосомные гены, не связана с ядрышками и, по-видимому, может находиться в неактивном состоянии.

Как показано ранее [23] и видно на рис. 4 и рис. 5, ядрышки интерфазных инфузорий *D. nasutum* имеют сложную структуру и могут состоять из нескольких соединенных между собой сетча-

тых ядрышек. В связи с этим возникает вопрос о том, как соотносится активность отдельных частей сложных ядрышек и как расположены хроматиновые тельца — ядрышковые организаторы в разных частях таких ядрышек. Для такого анализа определено среднее число хроматиновых телец типа I и II, приходящихся на единицу объема большого сложного ядрышка, и эти величины сопоставлены с параметрами для отдельных частей той же ядрышка. Эти величины оказались очень близкими. Например, у сытых интерфазных инфузорий среднее число хроматиновых телец типа I и II составляло 62.4 (на 1 мкм³ объема), а в четырех отдельных цепях — от 48.48 до 64.4 (рис. 4а). Аналогичной была картина и в ядрышках голодных интерфазных клеток *D. nasutum*. Эти данные позволяют заключить, что в среднем число активных ядрышковых организаторов в разных частях ядрышковых сетей примерно одинаково и, соответственно, примерно одинакова активность разных частей таких сложных сетчатых ядрышек.

То, что при снижении клеточной активности (в голодных инфузориях *D. nasutum*) уменьшается число околядрышковых хроматиновых телец, причем одновременно во всех частях сложных ядрышек, свидетельствует о существовании механизма, синхронизирующего работу отдельных частей сложных ядрышковых сетей. Косвенно это может указывать на то, что геном макронуклеуса *D. nasutum* организован в пространстве ядра строго определенным образом, подобно организации ядер высших эукариот по принципу хромосомных территорий [30], что обеспечивает контроль и синхронизацию процессов транскрипции и репликации в отдельных частях макронуклеуса.

Авторы выражают глубокую благодарность В.А. Григорьеву за помощь в техническом обеспечении экспериментов.

Работа поддержана ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007–2013 годы” (ГК 16.552.11.7034) и Российским фондом фундаментальных исследований (09-04-01731а и 11-04-01967а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hadjiolov A.A. 1985. The nucleolus and ribosome biogenesis. *Cell Biol. Monographs*. Wien–N.Y.: Springer-Verlag, **12**, 1–268.
2. Spector D.L. 2001. Nuclear domains. *J. Cell Sci.* **114**, 2891–2893.
3. Mosgoeller W. 2004. Nucleolar ultrastructure in vertebrate. In: *The nucleolus*. N.Y.: Kluwer Acad./Plenum Publ., 10–20.
4. Жарская О.О., Зацепина О.В. 2007. Реорганизация ядрышка в митозе. *Цитология*. **49**, 355–369.
5. Thiry M., Lafontaine D.L. 2005. Birth of nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. *Trends Cell Biol.* **15**, 194–199.
6. Hozak P., Zatssepina O., Vasilyeva E., Chentsov Y. 1986. An electron microscopic study of nucleolus-organizing regions at some stages of the cell cycle (Go period, G1-period, mitosis). *Biol. Cell.* **57**, 197–205.
7. Zatssepina O.V., Hozak P., Babajanyan D., Chentsov Y. 1988. Quantitative ultrastructural study of nucleolus-organizing regions at some stages of the cell cycle (Go-period, G2-period, mitosis). *Biol. Cell.* **62**, 211–218.
8. Guillot P.V., Martin S., Pombo A. 2005. The organization of transcription in the nucleus of mammalian cells. In: *Vision of the cell nucleus*. California: Amer. Sci. Publ., 95–105.
9. Sollner-Webb B., Tycowski K.T., Steitz J.A. 1996. Ribosomal RNA processing in eukaryotes. In: *Ribosomal RNA: structure, evolution, processing, and function in protein biosynthesis*. N.Y.: CRC Press, 469–490.
10. Nazar R.N. 2004. Ribosomal RNA processing and ribosome biogenesis in eukaryotes. *IUBMB Life.* **56**, 457–465.
11. Macgregor H.C. 1972. The nucleolus and its genes in amphibian oogenesis. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **47**, 177–210.
12. Thiebaud C.H. 1979. Quantitative determination of amplified rDNA and its distribution during oogenesis in *Xenopus laevis*. *Chromosoma.* **73**, 37–44.
13. Mais C., Scheer U. 2001. Molecular architecture of the amplified nucleoli of *Xenopus* oocytes. *J. Cell Sci.* **114**, 709–718.
14. Raikov I.B. 1982. *The protozoan nucleus. Morphology and Evolution*. Wien–N.Y.: Springer-Verlag.
15. Raikov I.B. 1989. Nuclear genome of the Protozoa. *Progr. Protozool.* **3**, 21–86.
16. Raikov I.B. 1995. Structure and genetic organization of the polyploid macronucleus of ciliates: A comparative review. *Acta Protozool.* **34**, 151–171.
17. Иванова Ю.Л., Леонова О.Г., Шупик М.А., Попенко В.И. 2002. Формирование хромонемоподобных фибрилл в соматических ядрах инфузорий под действием ионов магния. *Молекуляр. биология*. **36**, 842–848.
18. Gorovsky M. 1980. Genome organization and reorganization in *Tetrahymena*. *Annu. Rev. Genet.* **14**, 203–239.
19. Gall J.G. 1974. Free ribosomal RNA genes in the macronucleus of *Tetrahymena*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **71**, 3078–3081.
20. Engberg J. 1985. The ribosomal RNA genes of *Tetrahymena*: structure and function. *Eur. J. Cell Biol.* **36**, 133–151.
21. Maerker C., Harjes P., Neben M., Niemann H., Sianidis G., Lipps H.J. 1997. The formation of new nucleoli during macronuclear development of the hypotrichous ciliate *Stylonichia lemnae* visualized by *in situ* hybridization. *Chromosome Res.* **5**, 333–335.
22. Postberg J., Alexandrova O., Lipps H.J. 2006. Synthesis of pre-rRNA and mRNA is directed to a chromatin-poor compartment in the macronucleus of the spirotri-

- chous ciliate *Stylonychia lemnae*. *Chromosome Res.* **14**, 161–175.
23. Попенко В.И., Караджян Б.П., Леонова О.Г., Скарлато С.О., Ивлев Ю.Ф., Иванова Ю.Л. 2008. Трехмерная структура ядрышек инфузории *Didinium nasutum*. *Молекуляр. биология.* **43**, 510–517.
24. Karadzhan B.P., Raikov I.B. 1977. Fine structure of the nuclear apparatus of *Didinium nasutum* (Ciliophora, Gymnostata) in interphase and during binary fussion. *Protistologica.* **13**, 15–29.
25. Karajan B.P., Popenko V.I., Leonova O.G. 2003. Fine structure of nucleoli in the ciliate *Didinium nasutum*. *Protistology.* **3**, 99–106.
26. Леонова О.Г., Иванова Ю.Л., Ивлев Ю.Ф., Попенко В.И. 2003. Трехмерная реконструкция структуры хроматина в соматическом ядре инфузории *Bursaria truncatella*. *ДАН.* **391**, 403–406.
27. Леонова О.Г., Карджан Б.П., Ивлев Ю.Ф., Иванова Ю.Л., Попенко В.И. 2005. Ядерная оболочка, хроматин и ядрышки: исследование пространственных отношений в макронуклеусе *Didinium nasutum* с помощью стереорекострукции. *Биол. мембраны.* **22**, 265–272.
28. Karadzhan B.P., Raikov I.B. 1977. Fine structure of the nuclear apparatus of *Didinium nasutum* (Ciliophora, Gymnostata) in interphase and during binary fussion. *Protistologica.* **13**, 15–29.
29. Sabaneyeva E. 1997. Extrachromosomal nucleolar apparatus in the macronucleus of the ciliate *Paramecium putrinum* : LM, ME and confocal microscopy studies. *Arch. Protistenkd.* **148**, 365–373.
30. Postberg J., Lipps H.J., Cremer T. 2010. Evolutionary origin of the cell nucleus and its functional architecture. *Essays Biochem.* **48**, 1–24.