

ПЕРЕДАЧА РИБОСОМНОГО ХРОМАТИНА В МИТОЗЕ КЛЕТОК ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ПОЧКИ СВИНЬИ (ЛИНИЯ СПЭВ)

© В. Н. Стефанова,^{1,2} С. Ю. Демин²

¹ *Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных РАСХН, Санкт-Петербург—Пушкин, и*

² *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;*

¹ *электронный адрес: vestefan@mail.ru*

Ядрышковые организаторы (ЯОР) млекопитающих содержат гены рРНК, ассоциированные с аргентофильными белками, и могут быть специфично окрашены серебром. Эти гены формируют кластеры в четырех локусах мета- и субметацентрических хромосом 8-й и 10-й пар в кариотипе линии СПЭВ. Согласно нашим ранее опубликованным данным, ЯОР гомолога 8а хромосомы 8 содержит амплификацию рДНК, которая после серебрения хромосом проявляется как аномально большой Ag⁺-ЯОР. Изучали влияние такой избыточной рДНК на содержание Ag-негативного рибосомного хроматина в кариотипе. Был проведен морфометрический анализ Ag⁺-ЯОР хромосом из прометафазных пластинок с модальным числом хромосом. Обнаружено, что в индивидуальном наборе более длинный гомолог 10_L хромосомы 10 всегда содержит более крупный Ag⁺-ЯОР, чем более короткий гомолог 10_S. Таким образом, кариотип СПЭВ содержит две пары гетероморфных ЯОР: 8а и 8, 10_L и 10_S. Половина проанализированных наборов хромосом содержала четыре Ag⁺-ЯОР, другая половина имела один Ag-негативный ЯОР, который со сходной частотой принадлежал либо хромосоме 8, либо 10_S. Большая часть прометафазных Ag⁺-ЯОР была частично или полностью расщеплена на хроматиды, что позволило измерить площадь Ag⁺-ЯОР (сестринских) хроматид. Отношение площадей большего к меньшему Ag⁺-ЯОР хроматиды сильно варьировало для всех хромосом набора, за исключением 8а. Максимальное значение этого отношения достигало 5.1 для хромосомы 8, 3.4 и 2.3 — для 10_L и 10_S (против 1.6 для 8а). Хромосом с отношением, равным 1.25 и выше, было найдено среди хромосом: 8а — менее четверти, 10_L и 10_S — около половины, 8 — более двух третей. Эти данные указывают на то, что прогрессивная дифференциация сестринских хроматид по содержанию Ag-негативного рибосомного хроматина может привести к неравному распределению Ag⁺-ЯОР между дочерними клетками. Проверка этого предположения была осуществлена на двухмерных (2D) препаратах растянутых клеток СПЭВ, полученных без гипотонической обработки живых клеток, которая приводит к одинаковому уровню серебрения ЯОР и «проядрышек» в раннетелофазных фиксированных клетках. Обнаружено, что для некоторых дочерних ядер таких клеток характерно расщепление Ag⁺-ЯОР, равное 4 : 3 вместо обычного 4 : 4. Комплементарные данные были получены методом 2D FISH с пробой 28S + 18S рДНК норки. Показано, что раннетелофазные локусы рДНК выявляются в виде четырех ярко флуоресцирующих пятен, которые по своим размерам и форме близки Ag⁺-ЯОР соответствующих клеток. В некоторых случаях, однако, одно из дочерних ядер содержало три таких домена и один тусклый линейный FISH-сигнал, который, по-видимому, представлял собой несеребрящийся ЯОР. Установлено, что Ag⁺-ЯОР хромосомы 8а, самому крупному в кариотипе СПЭВ, присущ высокий уровень когезии и (или) скрученности сестринских хроматид, что характерно для профазных, но не прометафазных хромосом данной линии клеток. Эти наблюдения и литературные данные, приведенные в статье, свидетельствуют об обогащенности Ag⁺-ЯОР хромосомы 8а неактивным и (или) малоактивным позднореплицирующимся хроматином.

Ключевые слова: конверсия гетерохроматина, наследуемый транскрипционный сайленсинг («глушение»), гетерохроматизация, рибосомный хроматин, ядрышковые организаторы, 2D FISH.

Принятые сокращения: ПФК — плотный фибриллярный компонент ядрышка, р-хроматин — рибосомный хроматин, т. п. н. — (число) тысяч пар нуклеотидов, ФГА — фитогемагглютинин, ФЦ — фибриллярный(е) центр(ы) ядрышка, ЯОР — ядрышковый(е) организатор(ы) (хромосомы или хроматиды), ЯОР-хромосома — хромосома, содержащая ЯОР, Ag⁺-ЯОР — серебящийся ЯОР, DAPI — 4',6'-диамидино-2-фенилиндол, 2D FISH — двухмерный (2D) вариант флуоресцентной *in situ*-гибридизации (нуклеиновых кислот) на препаратах спредов интерфазных ядер и митотических хромосом, Pol I — РНК-полимераза I, UBF (upstream binding factor) — фактор транскрипции Pol I.

Ядрышки в клетках млекопитающих, за исключением клеток с так называемыми персистентными ядрышками (Goessens, 1984; DiMario, 2004), разбираются в тече-

ние профазы—ранней прометафазы митоза. В поздней анафазе—ранней телофазе митоза начинается процесс реорганизации ядрышек, или нуклеологенез, который за-

вершается в поздней телофазе возобновлением транскрипционной активности ядрышка (см. обзоры: Olson et al., 2002; DiMario, 2004). По данным этих обзоров, индукция нуклеологенеза связана прежде всего с активизацией так называемых ядрышковых организаторов (ЯОР), а затем с взаимодействием активированных ЯОР с белками разобранного ядрышка. Эти белки сосредоточены в перихроматиновом чехле хромосом, цитоплазматических тельцах NDF (nucleolus-derived foci) и ядерных тельцах PNB (prenucleolar bodies).

Термин «ЯОР» появился еще в период классической цитогенетики, однако сохранился в научном обиходе до сих пор (DiMario, 2004). Вместе с тем содержание этого понятия в молекулярную эпоху неоднократно подвергалось существенным изменениям (Howell, 1982; Weissenberger, Scheer, 1995). В последнее время под ЯОР понимают локусы рДНК, которые могут находиться в нескольких альтернативных функциональных состояниях (Hernandez-Verdun, Roussel, 2003; Raška, 2003; Raška et al., 2004). В интерфазе наблюдаются как минимум три таких состояния (конформации) локуса рДНК: 1) кластер инактивированных генов; 2) кластер генов с ассоциированными факторами транскрипции, в котором могут быть активны отдельные гены; 3) рассредоточенные гены с факторами транскрипции и транскрипционной активностью. В митозе один и тот же ЯОР может оказаться в одном из двух известных состояний — диссоциации или же ассоциации с факторами транскрипции. Считается, что второе состояние ЯОР с высокой вероятностью соответствует транскрипционно компетентным генам, т. е. таким локусам рДНК, которые были в активном состоянии в предшествующей интерфазе (Gébrane-Younès et al., 1997). Число ЯОР в хромосомном наборе разных видов млекопитающих сильно варьирует. Так, в гаплоидном кариотипе кенгуровой крысы всего один ЯОР, который расположен в половой X-хромосоме (Hsu et al., 1975). Отсюда, в диплоидных XY-клетках самцов этих животных содержится одна ЯОР-хромосома, а в XX-клетках самок — две. В диплоидном кариотипе домашней свиньи по одному ЯОР несут две пары аутосом (Czaker, Maug, 1980), а в кариотипе человека — пять пар (Howell, 1982). ЯОР митотических хромосом млекопитающих обычно тесно ассоциированы со специфичными для ядрышка белковыми факторами транскрипции: РНК-полимеразой I (Pol I), UBF, SL 1, а также топоизомеразой I (Scheer, Rose, 1984; Matsui, Sandberg, 1985; Haaf, Schmid, 1991; Roussel, Hernandez-Verdun, 1994). Такие ЯОР формируют вторичные перетяжки на хромосомах и могут окрашиваться серебром, восстанавливая его из водных растворов нитрата или протеината серебра или же аммонийного серебра (Hernandez-Verdun, 1986; Сабанеева, 1989; Weissenberger, Scheer, 1995; Roussel et al., 1996; Thiry, Goessens, 1996; Heliot et al., 1997). Отложения металлического серебра четко регистрируются на уровне световой и электронной микроскопии. Предполагалось, что основными аргентофильными (Ag^+)-белками ЯОР метафазных хромосом являются Pol I и UBF (Robert-Fortel et al., 1993; Roussel, Hernandez-Verdun, 1994; Héliot et al., 1997; Suja et al., 1997). Однако не так давно UBF был выведен из состава Ag^+ -белков митотических ЯОР, и вместо него основным Ag^+ -белком считают либо Pol I, либо ее субединицу pp 135 (Bell et al., 1997). Показано, что ЯОР метафазных хромосом млекопитающих, позитивные в отношении компонентов транскрипции и (или) окраски серебром, являются транскрипционно компетентными, т. е. активными в предшествующей интерфазе и в начале следующей за митозом интерфазы. И наоборот, те из ЯОР, которые не содержат компонентов транскрипции и (или) не окрашиваются серебром, являются транскрипционно некомпетентными, или инактивированными в предшествующей интерфазе (Roussel et al., 1996; Sirri et al., 2000). Как активные, так и инактивированные ЯОР содержат тандемные повторы рибосомных генов. Единичный ген рРНК состоит из смежных транскрибируемой (13.3 т. п. н.) и нетранскрибируемой (около 30 т. п. н.) ДНК-последовательностей (Hsu et al., 1975; Hadjiolov, 1985; Sylvester et al., 2004). Он кодирует длинный предшественник рРНК (45S-47S пре-рРНК). 45S-47S пре-рРНК начиная с 5'-конца состоит из внешнего спейсера, 18S рРНК, внутреннего спейсера, 5.8S рРНК, другого внутреннего спейсера и 28S рРНК. Вследствие высокой гетерогенности кластеры рДНК недоступны для существующих методов сиквенирования геномной ДНК (Kawasaki et al., 1992). По этой причине точно оценить число генов в таком кластере пока что не представляется возможным. В обзорах по ядрышку млекопитающих приводятся ориентировочные оценки размеров кластеров рДНК, но лишь для одного генома — генома человека. По этим расчетам гаплоидный геном человека содержит в среднем около 400 копий сложных локусов рДНК размером 43.3 т. п. н. (Worton et al., 1988). Рестриктивный анализ фракционированной рДНК человека, обработанной EcoRV, показал, что эта ДНК либо распадается на фрагменты сходной длины размером около 3000 т. п. н. (Sakai et al., 1995), либо представлена серией фрагментов размером от 700 до 1600 т. п. н. (Srivastava et al., 1993). На основании результатов этих работ было вычислено, что средний ЯОР человека содержит порядка 70 генов рРНК (Sakai et al., 1995). Поскольку иных кодирующих РНК, кроме пре-рРНК, в ядрышке до сих пор не найдено, хроматин ЯОР чаще всего обозначают как рибосомный (р-хроматин) (см. обзор: Raška et al., 2004). На основании данных оптической и электронной томографии ЯОР млекопитающих и человека было постулировано, что не диссоциирующий в митозе комплекс рДНК с Ag^+ -белками представляет собой особую разновидность рибосомного хроматина (Heliot et al., 1997). Воспользовавшись этим постулатом, мы обозначили серебриющиеся участки транскрипционно компетентных ЯОР как аргентофильный р-хроматин.

По ультраструктурным данным, фибриллярные центры (ФЦ) и плотный фибриллярный компонент (ПФК) интерфазного ядрышка также обогащены Ag^+ -белками (см. обзоры: Hernandez-Verdun, 1986; Сабанеева, 1989; Thiry, Goessens, 1996). ФЦ и отчасти ПФК хорошо выявляются при использовании самых разных техник окрашивания клеточных ядер водными растворами солей серебра (см. обзор: Hernandez-Verdun, 1986). Использование разнообразных электронно-микроскопических вариантов такого окрашивания при этом отражается только на размере гранул серебра и их количестве в посеребрённых структурах. Отмечается также варьирование интенсивности окраски между ФЦ и ПФК, которое зависит преимущественно от структурно-функционального состояния ядрышка. В компактном ядрышке чаще более интенсивно окрашиваются ФЦ, чем ПФК, а в ретикулярном ядрышке чаще наблюдается обратная картина окрашивания. ДНК в ядрышке клеток человека и млекопитающих существует в двух формах: нетранскрибируемой нуклеосомной и, по крайней мере частично, транскриби-

руемой «безнуклеосомной» (Raška et al., 1995, 2004; Raška, 2003). ДНК внутри ядрышка обнаруживается только в составе ФЦ и ПФК. Гранулярный компонент ядрышка ДНК не содержит. Нетранскрибируемой ДНК в ядрышке значительно больше, чем транскрибируемой.

ФЦ считаются интерфазным «дубликатом» ЯОР митотических хромосом, что подтверждается ультраструктурными и биохимическими данными (Goessens, 1984). Типичные ФЦ, в частности, найдены на ультратонких срезах метафазных ЯОР-хромосом клеток линии СПЭВ, произошедшей из эмбриональной почки домашней свиньи (Hozak et al., 1986). В этой работе показано, что именно ФЦ, скорее всего, и выявляются как Ag^+ -ЯОР. Несколько позже на том же объекте были получены данные о том, что индивидуальные метафазные ЯОР-хромосомы и даже сестринские хроматиды таких хромосом могут различаться между собой по размеру ФЦ (Зацепина и др., 1988; Зацепина, Стефанова, 1993).

Межхромосомные различия по размеру метафазных ЯОР клеток СПЭВ были подтверждены данными световой микроскопии (Stefanova, 1990; Мамаева, 2002). Нами было установлено, что в диплоидном кариотипе СПЭВ из Коллекции клеточных культур Института цитологии РАН содержатся четыре ЯОР, которые расположены в районах вторичных перетяжек хромосомных пар 8 и 10. При этом для гомологов хромосомы 8 характерен ярко выраженный гетероморфизм по размеру Ag^+ -ЯОР. Вместе с тем кариотипическая изменчивость по размеру Ag^+ -ЯОР в культуре клеток СПЭВ осталась неисследованной в количественном отношении. Не были подтверждены и интригующие данные о возможности гетероморфизма ЯОР сестринских хроматид — феномене, не вписывающемся в существующие представления о митотической организации аргентофильного р-хроматина. Неисследованной оказалась и сама картина передачи такого хроматина в ана-телофазе митоза клеток СПЭВ.

В настоящей работе была поставлена задача восполнить указанные пробелы в изучении структурного гетероморфизма аргентофильного р-хроматина митотических клеток СПЭВ. Исследование также содержит данные о распределении рДНК в пределах ЯОР дочерних раннетелофазных ядер. Особенностью настоящей работы является то, что она выполнена на препаратах высокоразрешенных прометафазных хромосом, полученных из гипотонированных клеток, и на препаратах растянутых интерфазных ядер и митотических фигур, которые были приготовлены без использования гипотонии. Другая особенность работы — необычный эпигенетический аспект рассмотрения собственных и изложенных в литературе экспериментальных данных по структурной гетерогенности ЯОР клеток человека и млекопитающих. Эти данные будут обсуждаться и даже отчасти излагаться исходя из логики таких эпигенетических феноменов, как транскрипционный сайленсинг («глушение»), гетерохроматизация, конверсия гетерохроматина в эухроматин, в изучении которых в последние годы были достигнуты впечатляющие успехи.

Материал и методика

Работа выполнена на постоянной клеточной линии СПЭВ, произошедшей из ткани эмбриональной почки домашней свиньи. Использовали монослойную культуру СПЭВ из Коллекции клеточных культур Института ци-

тологии РАН, хромосомный набор которой был детально охарактеризован нами ранее (Stefanova, 1990; Мамаева, 2002). Модальный кариотип этой линии — 40, XX, модальное число ЯОР-хромосом равно 4.

Для приготовления препаратов использовали клетки 2-суточной культуры, которую вели в CO_2 -инкубаторе при 37 °С на среде, содержащей RPMI 1640 и 10 % сыворотки крови эмбрионов коров («Биолот», Россия).

Препараты расправленных митотических хромосом готовили по общепринятой методике из суспензии гипотонированных клеток, зафиксированных в смеси метанол—ледяная уксусная кислота (3 : 1). Анализировали только кариотипы с модальным числом хромосом из прометафазных клеток, которые идентифицировали на основании корреляции между длиной и разрешением G(R)-сегментов (бэндов) хромосомы (Lemke et al., 2002). По данным этой работы, метафазные хромосомы человека, которые имеют разрешение 200—300 бэндов (на гаплоидный набор хромосом), вдвое короче раннеметафазных хромосом из пластинок разрешением 450 бэндов и втрое короче прометафазных хромосом из пластинок разрешением 600—650 бэндов. Столь существенные различия в разрешении и относительной длине метафазных и прометафазных хромосом, по-видимому, являются воспроизводимым артефактом гипотонической обработки клеток, подвергающихся фиксации смесью в соотношении 3 : 1 (Claussen et al., 2002). Разница между длинами хромосом метафазных и прометафазных клеток *in situ* — невелика, если вообще существует. Вместе с тем иного способа различения прометафазных хромосом от метафазных на препаратах хромосом из клеток, инкубированных в условиях гипотонии, чем сопоставление их по разрешению или относительной длине, не существует. По этой причине мы считали прометафазными только такие ЯОР-хромосомы на препаратах гипотонированных клеток, у которых наблюдали дистальное расщепление сестринских хроматид, отсутствующее в профазе (см. раздел «Результаты»), и трехкратное и более превышение значения максимальной длины Ag^+ -ЯОР-хромосом метафазных клеток, растянутых без использования гипотонии. Пороговое значение длины составляло для прометафазной ЯОР-хромосомы 8 7.8 мкм, для хромосомы 10 — 5.1 мкм.

Для получения препаратов растянутых ядер СПЭВ применяли разработанный нами метод, в котором аннулирован этап гипотонической обработки клеток (Демин, 1997, 1999), с некоторыми модификациями. Клетки СПЭВ снимали с подложки с помощью тefлонового шпателя и переносили пипеткой в пластиковые микропробирки Eppendorf. Закрытые крышечкой пробирки переворачивали и встряхивали до получения суспензии клеток, которую затем быстро осаждали с помощью центрифуги для микропробирок (Elphi, Латвия). Осадок клеток отделяли от супернатанта и перемешивали с помощью вортекса. К ресуспендированному клеточному осадку объемом 100 мкл добавляли 100 мкл 0.01 %-ного раствора неполярного детергента Тритона X-100 (Ferak, Германия), приготовленного *ex tempore* на переосажденной питательной смеси, в которой проходило культивирование этих клеток. Суспензию клеток в детергенте в течение 0.5—1.0 мин пипетировали в капиллярном объеме пастеровской пипетки, а затем выливали в пробирку со свежеприготовленным фиксатором (3 : 1) и тщательно встряхивали. После этого клетки трижды переосаждали в свежей порции фиксатора. Сгущенную суспензию кле-

ток в последней смене фиксатора раскапывали на поверхность предметных стекол, смоченных 2 %-ным водным раствором Тритона X-100. Раствор детергента и излишки фиксатора удаляли с препаратов с помощью полосок фильтровальной бумаги, которые размещали на периферии предметного стекла. Суховоздушные препараты помещали на хранение в герметично запечатанном боксе при -20°C до использования.

ЯОР митотических и интерфазных хромосом окрашивали азотнокислым серебром (Howell, Black, 1980). Флуоресцентную гибридизацию *in situ* с биотинилированной пробой 28S + 18S рДНК из космидной библиотеки норки (Christensen et al., 1996) проводили по протоколу, предложенному для хромосом свиньи (Chowdhary et al., 1995). Проба была любезно предоставлена Т. Паудсепп (Royal Veterinary and Agricultural University, Frederiksberg, Дания). Детекцию FISH-сигнала осуществляли с помощью флуоресцеин-авидина (Vector Laboratories, США) и последующей одноступенчатой амплификации биотинилированным антиавидином (Vector Laboratories, США). На завершающем этапе препараты окрашивали флуорохромом DAPI в растворе антифейда (Vectashield, Vector Laboratories, США). Фотографирование препаратов проводили на микроскопах AxioPhot (Opton) и Vanox T (Olympus) с помощью как пленочной, так и цифровой камеры (цветная 4-мегапиксельная камера Olympus C-4000Z). Клетки, окрашенные азотнокислым серебром, фотографировали на пленку «Микрат-изопан», а препараты FISH — на пленку А2Ш («Тасма», Россия). Полученные негативы оцифровывали с помощью сканера для пленок Scan Wit 2720S (Acer) с оптическим разрешением 2700 dpi. Разрешение полученных изображений при этом составляло 27 пикселей на 1 мкм объекта.

Морфометрические измерения Ag^+ -ЯОР митотических и интерфазных хромосом осуществляли с помощью программ AdobePhotoshop 5.0 LE и Image Tool 3.0. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Statistica 5.0 и Excel. Опре-

деление статистически значимой разницы средних значений изучаемых параметров осуществляли с помощью *t*-теста (критерия Стьюдента). В тексте статьи на осуществленную оценку различий указывают приведенные в скобках значения вероятности альтернативной гипотезы, например ($P = 0.97$).

Результаты

На рис. 1 и 5 представлены типичные изображения посеребренных митотических фигур клеток СПЭВ, растянутых и распластанных без применения гипотонии. Хорошо видно, что на всех стадиях митоза импрегнация серебром подвергаются конденсированные участки митотических хромосом и ЯОР, которые на цветных снимках выглядят соответственно серовато-коричневыми и черными. В профазе митоза в желто-коричневый цвет дополнительно окрашивается содержимое ядрышка, обедненное хроматином (рис. 1, *a*). В прометафазе—ранней телофазе видны также коричневатые цитоплазматические тельца NDF (рис. 1, *б*; 5, *a—г*), а в некоторых ядрах раннетелофазных клеток — еще и темно-коричневые тельца PNB (рис. 5, *д*). Окраска хромосом метафазных пластинок была желто-коричневой с серо-коричневыми крапинами, которые, по-видимому, представляют собой ядрышковый материал перихроматинового чехла хромосом (рис. 5, *a*). Измерения, проведенные нами на цветных изображениях с помощью программы AdobePhotoshop 5.0 LE, показали, что интенсивность окрашивания ЯОР была минимум на треть выше таковой конденсированного хроматина и телец NDF и PNG. Такой разницы вполне достаточно для визуальной идентификации Ag^+ -ЯОР.

Конъюгация сестринских хроматид у некоторых из профазных хромосом была ослабленной (рис. 1, *a*). В этом случае было хорошо видно, что сестринские хроматиды скручены в виде плектонемической спирали с

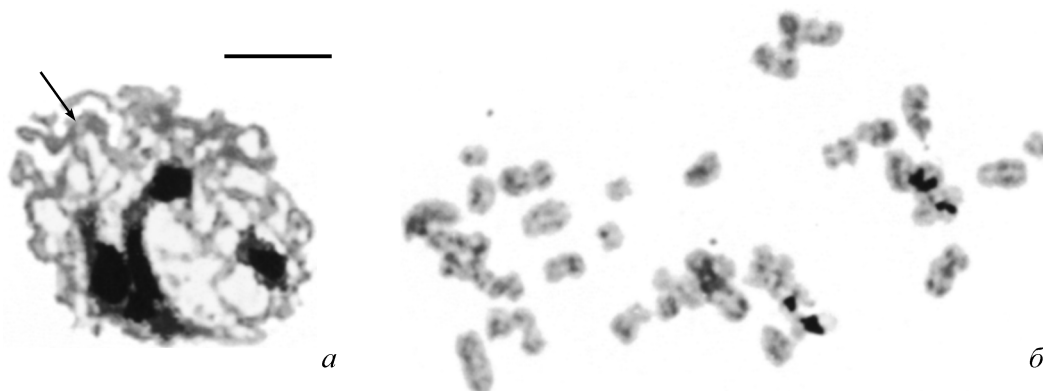


Рис. 1. Профазная (*a*) и прометафазная (*б*) клетки на двухмерном (2D) препарате клеток СПЭВ, полученном без применения гипотонии.

a — хромосомная область с нарушением конъюгации сестринских хроматид, в которой выявляется их скрученность в виде плектонемической спирали (стрелка); *б* — все хромосомы прометафазной фигуры расщеплены на хроматиды; мелкие гранулы в цитоплазме — тельца NDF (nucleolus-derived foci); *a, б* — видны четыре Ag^+ -ЯОР в виде черных областей на светло-серых хромосомах. Окраска азотнокислым серебром. Масштабная линейка — 5 мкм.

Fig. 1. Prophase (*a*) and early prometaphase (*б*) cells on two-dimensional (2D) preparations of PK cells obtained without hypotonic treatment.

a — chromosomal area with disconjugation of sister chromatids reveals their twisting as a plectonemic spiral (arrow); *б* — all chromosomes of prometaphase figure are split into chromatids; small granules in the cytoplasm are nucleolus-derived foci (NDF); *a, б* — four Ag^+ -NORs look as black domains on light grey chromosomes. Silver nitrate staining. Scale bar — 5 μm .

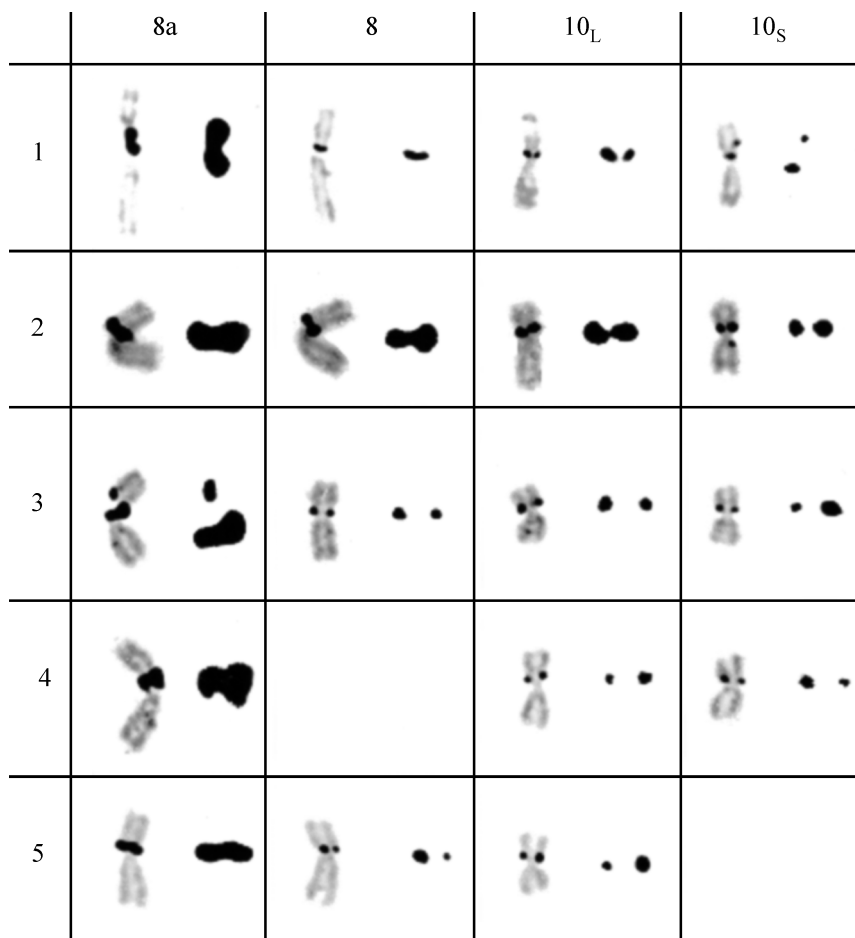


Рис. 2. Прометафазные кариотипы Ag^+ -ЯОР-хромосом, распланных с помощью общепринятого метода, после применения гипотонической обработки клеток СПЭВ.

Ряды — частичные кариотипы Ag^+ -ЯОР-хромосом, колонки — идентификационный номер хромосомы в модальном кариотипе СПЭВ, ячейки таблицы — вид хромосомы (слева) и увеличенного изображения Ag^+ -ЯОР (справа). Окраска азотнокислым серебром и по Гимза.

Fig. 2. Prometaphase karyotypes of Ag^+ -NOR bearing PK chromosomes conventionally spread after hypotonic treatment.

Rows — partial karyotypes of Ag^+ -NOR-chromosomes, columns — chromosome identification number in PK modal set, table cells — view of the whole chromosome (on the left) and increased image of Ag^+ -NOR (on the right). Staining with silver nitrate (black) and after Romanovsky—Giemsa (light grey).

небольшим числом витков. Большая часть хромосом профазного ядра, однако, не имела отчетливых признаков раскручивания или расщепления хроматид.

На рис. 1, б представлена растянутая прометафазная клетка без каких-либо признаков метафазной агрегации хромосом. Судя по такой морфологии, эта клетка была зафиксирована в ранней прометафазе — сразу после распада ядерной оболочки или на начальном этапе схождения хромосом в экваториальную пластинку. Тем не менее даже в такой прометафазной клетке все хромосомы расщеплены на хроматиды по всей длине, за исключением центромерной области. Клетки такого типа удобны для измерения длины ЯОР-хромосом прометафазного набора. По нашим данным, длина прометафазной ЯОР-хромосомы 8 составляла 3.5—4.0 мкм, а ЯОР-хромосомы 10 — 1.7—2.0 мкм.

На рис. 5, а представлена растянутая метафазная клетка со сформированной экваториальной пластинкой. Хорошо видно, что растягивание клетки не привело к разобщению хромосом митотической фигуры. Исключение составили так называемые запаздывающие хромосомы, вхождение которых в пластинку задерживается. В число

таких хромосом иногда попадают ЯОР-хромосомы, что позволяет провести измерения их длины в метафазе. По нашим данным, длина метафазной ЯОР-хромосомы 8 варьирует от 2.0 до 2.6 мкм, а ЯОР-хромосомы 10 — от 1.2 до 1.7 мкм.

Таким образом, в клетках СПЭВ, не подвергавшихся воздействию гипотонии, можно легко различать все стадии митоза. Установлено, что в таких клетках прометафазные и метафазные хромосомы отличаются от профазных хромосом почти полным расщеплением сестринских хроматид, а между собой — по длине.

Хромосомы метафазных и прометафазных клеток СПЭВ на препаратах, полученных с помощью гипотонической обработки, резко отличаются друг от друга по длине. На длинных прометафазных хромосомах структура Ag^+ -ЯОР разрешается гораздо лучше, чем на коротких метафазных хромосомах. В конечную выборку прометафазных пластинок для морфометрического анализа были отобраны 24 пластинки без наложения и контактов ЯОР-хромосом с другими хромосомами набора. Число хромосом в них варьировало от 42 до 43, а число Ag^+ -ЯОР-хромосом — от 3 до 4. По этим параметрам изученная куль-

тура вполне соответствовала ранее описанному кариотипу линии СПЭВ из коллекции Института цитологии РАН (Мамаева, 2002). В пластинках наблюдали субметацентрические и метацентрические ЯОР-хромосомы, которые, по ранее полученным данным, соответствуют парам хромосом 8 и 10 (Stefanova, 1999). Ag⁺-ЯОР одного из гомологов хромосомы 8 по своим размерам значительно превосходил Ag⁺-ЯОР других хромосом пластинки и служил своеобразным маркером этой хромосомы (рис. 2). Эта хромосома была обозначена нами как хромосома 8a. Длина этой хромосомы (10.36 ± 0.28 мкм) была достоверно меньше длины гомологичной ей хромосомы 8 (8.97 ± 0.26 мкм). Большой и меньший гомологи хромосомы 10 по этому параметру не различались: их длины составляли соответственно 6.50 ± 0.16 и 6.27 ± 0.18 мкм. Соотношение длин хромосомы 8 и большего гомолога хромосомы 10, вычисленное для индивидуальных клеток, составляло 1.38 ± 0.03 . Судя по этим цифрам, даже наиболее сходные из разноименных ЯОР-хромосом можно легко распознать в кариотипах визуально по относительным размерам, без проведения измерений и вычисления индекса плеч.

В 14 из 24 изученных кариотипов окрашивались все 4 ЯОР-хромосомы, в 5 не выявлялась хромосома 8 и в 5 — хромосома 10 (рис. 2). Гистограммы распределения площади Ag⁺-ЯОР для каждой из ЯОР-хромосом набора представлены на рис. 3, а. Для упрощения описания полученных данных более длинный гомолог хромосомы 10, который, как правило, содержал более крупный Ag⁺-ЯОР, был обозначен нами как хромосома 10_L, а более короткий гомолог хромосомы 10 с меньшим Ag⁺-ЯОР — как хромосома 10_S. На гистограмме (рис. 3, а) видны высокая трансгрессия данных для хромосом 8, 10_L и 10_S и низкая трансгрессия между массивами данных для ЯОР хромосом 8a и для ЯОР остальных хромосом. По размаху изменчивости площади Ag⁺-ЯОР эти хромосомы распределяются следующим образом: $10_S < 10_L < 8 < 8a$. Среднее значение площади Ag⁺-ЯОР составляло: для хромосомы 8a — 2.72 ± 0.22 мкм², 8 — 0.58 ± 0.11 , 10_L — 0.63 ± 0.08 , 10_S — 0.40 ± 0.08 мкм². В индивидуальных кариотипах с четырьмя Ag⁺-ЯОР-хромосомами чаще всего Ag⁺-ЯОР хромосомы 10_L был крупнее такового хромосомы 8 (рис. 2, кариотипы 1, 3), однако встречались и обратные ситуации (рис. 2, кариотип 2). Ag⁺-ЯОР хромосомы 8a был в среднем на 1.6 мкм² больше такового у хромосом 8 и 10_L и на 1.8 мкм² больше такового у хромосомы 10_S ($P = 0.96-0.97$). Статистическая оценка показала также, что между гомологами хромосомы 10 имеются небольшие различия по среднему значению площади Ag⁺-ЯОР ($P = 0.95$). На основании этих данных можно считать, что обе пары ЯОР-хромосом являются гетероморфными по площади Ag⁺-ЯОР. По нашим данным, площадь Ag⁺-ЯОР хромосомы 8a в среднем больше такового хромосомы 8, 10_L и 10_S в 3.34, 3.17 и 4.90 раза соответственно.

Как показано выше, митотические хромосомы клеток СПЭВ начиная с прометафазы расщеплены на две хроматиды, которые удерживаются вместе за счет центромерных участков хромосом. Явление сцепления, спаянности сестринских хроматид обозначается в литературе термином «когезия» (cohesion) хроматид. Кроме центромер когезия может иметь место по теломерным и интерстициальным участкам митотических хромосом, содержащим позднореплицирующийся гетерохроматин. Описана когезия хроматид по ЯОР метафазных хромо-

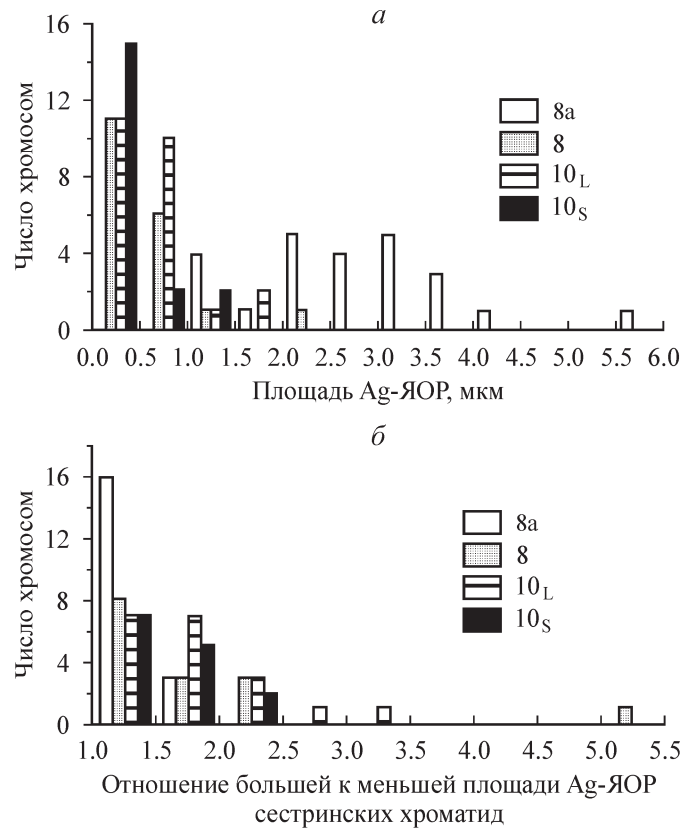


Рис. 3. Сопоставление распределений индивидуальных хромосом по площади всего Ag⁺-ЯОР (а) и по отношению площадей большего к меньшему Ag⁺-ЯОР сестринской хроматиды (б) для всех ЯОР-хромосом (8a и 8, 10_L и 10_S) модального кариотипа СПЭВ.

Fig. 3. Comparison between distribution patterns of individual chromosomes, according to the total Ag⁺-NOR area (a) and to area ratio of larger/smaller Ag⁺-NOR of sister chromatids (b) for all NOR bearing chromosomes (8a and 8, 10_L and 10_S) of PK modal set.

сом ФГА-стимулированных лимфоцитов человека, где она встречается не так уж редко (Heliot et al., 1997, 2000). По этим данным, Ag⁺-ЯОР при когезии хроматид имеет вид поперечной полосы или гантелеобразной фигуры, соединяющей сестринские хроматиды. Сходного типа Ag⁺-ЯОР были найдены нами со следующими частотами: для хромосом 8a и 8 — по 5 случаев, 10_L — 9 случаев, 10_S — 1 случай (рис. 2; 4, колонка 1). Латеральная агрегация Ag⁺-ЯОР хроматид в той или иной степени была присуща всем хромосомам 8a (рис. 4). Вместе с тем только четыре хромосомы 8a (16.7%) содержали суженный Ag⁺-ЯОР без каких-либо признаков продольного расщепления и с характерным схождением примыкающих к нему сестринских хроматид. В остальных случаях межхроматидная щель доходила непосредственно до Ag⁺-ЯОР, в области которого наблюдали расширение хромосомы и неполное продольное расщепление (рис. 2, 4). Такое расщепление могло быть дистальным — 6 случаев (рис. 4, колонки 1, 3), проксимальным — 3 случая (рис. 4, колонка 5), дистальным и проксимальным — 6 случаев (рис. 4, колонки 2, 4), дистальным и центральным — 1 случай (рис. 4, колонка 7). Кроме того, в 3 случаях наблюдали перекрут Ag⁺-ЯОР-хроматид (рис. 4, колонка 6).

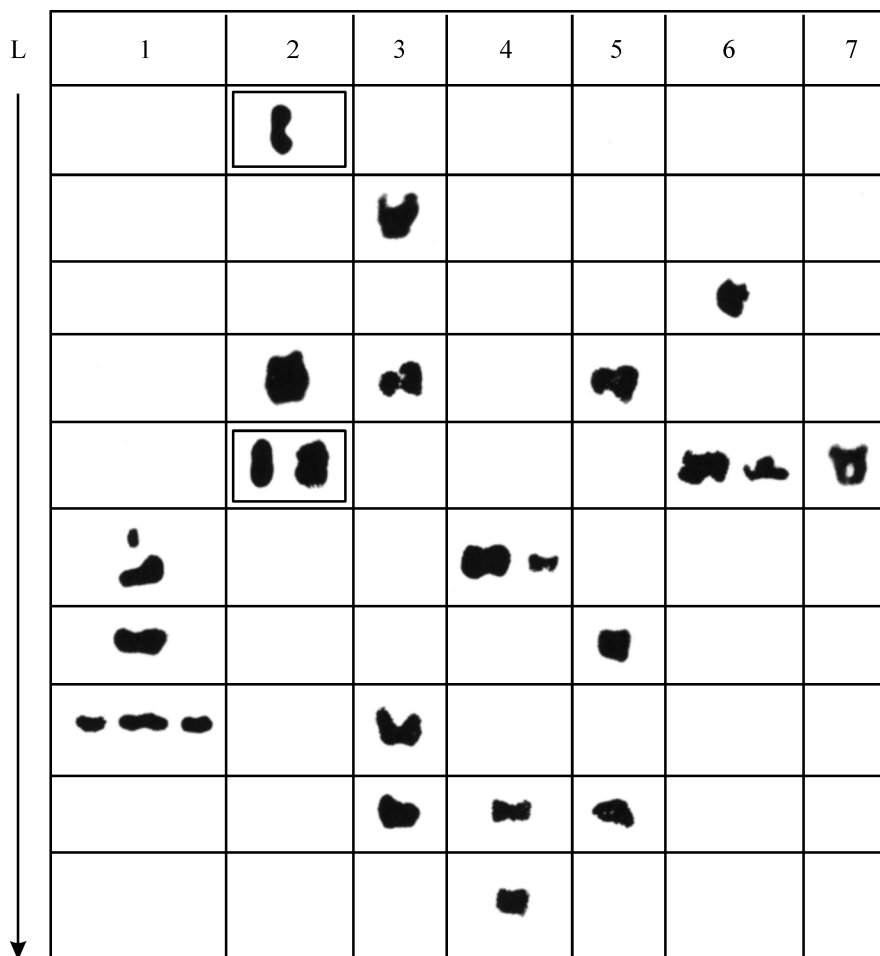


Рис. 4. Типы серебрения прометафазного ЯОР хромосомы 8а из клеток СПЭВ на препаратах спрэдов хромосом, приготовленных общепринятым методом.

Стрелка слева — направление уменьшения длины хромосомы (L), ряды — хромосомы сходной длины, колонки — тип серебрения ЯОР, ячейки таблицы — изображения Ag⁺-ЯОР; обранные Ag⁺-ЯОР отмечают максимальный уровень когезии сестринских хроматид.

Fig. 4. Silver staining patterns for NOR of chromosome 8a on conventional PK chromosome spreads.

Arrow on the left — direction of decrease in the total chromosome length (L), rows — chromosomes of similar length, columns — individual Ag⁺-NOR patterns, table cells — images of Ag⁺-NORs; framed Ag⁺-NORs indicate the maximum level of sister chromatid cohesion.

Всего нами было найдено шесть базовых и один редкий тип Ag⁺-ЯОР хромосомы 8а, которые представлены на рис. 4. Этот рисунок имеет структуру таблицы, строки которой объединяют хромосомы сходной длины, а колонки — Ag⁺-ЯОР одного типа. Выделенные типы могут быть охарактеризованы следующим образом: 1) Ag⁺-ЯОР в виде неширокой полосы (или полумесяца), которая располагается поперек хромосомы (рис. 4, колонка 1); 2) Ag⁺-ЯОР в виде единичной, или спаренной гантелеобразной, или палочковидной структуры, ориентированной вдоль хромосомы (рис. 4, колонка 2); 3) дистально расщепленный Ag⁺-ЯОР с дистальной же редукцией зоны аргентофилии по одной из хроматид (рис. 4, колонка 3); 4) Ag⁺-ЯОР в виде бабочки, результат неполного дистального и проксимального расщепления хроматид (рис. 4, колонки 1, 3); 5) проксимально расщепленный Ag⁺-ЯОР с проксимальной же редукцией зоны аргентофилии по одной из хроматид (рис. 4, колонка 5); 6) Ag⁺-ЯОР с перекрутом зон аргентофилии сестринских хроматид (рис. 4, колонка 6); 7) дистально и центрально расщепленный Ag⁺-ЯОР.

Анализ данных рис. 4 показывает, что Ag⁺-ЯОР 1-го типа формируют компактный кластер среди хромосом относительно небольшой длины. Редукция размеров в отличие от сегрегации сестринских хроматид у Ag⁺-ЯОР этого типа, по-видимому, положительно коррелирует с митотической конденсацией хромосом. Ag⁺-ЯОР 2-го типа встречаются среди наиболее длинных хромосом. Ag⁺-ЯОР оставшихся базовых типов встречаются среди прометафазных хромосом любых размеров. Судя по распределению Ag⁺-ЯОР в ячейках таблицы (рис. 4), сколько-нибудь значимой связи между редукцией размеров Ag⁺-ЯОР, расщеплением хроматид и митотической конденсацией хромосом у Ag⁺-ЯОР типов 2—6, по-видимому, не существует.

Наиболее длинные из Ag⁺-ЯОР хромосомы 8а имели одно (тип 2) или даже два (тип 3) сужения, что можно рассматривать как указание на то, что эти структуры в предшествующей профазе состояли из двух или даже трех частей. Исследованные 24 прометафазных кариотипа содержали всего два хроматидных разрыва и при этом оба пришлось на центральную область Ag⁺-ЯОР (рис. 2,

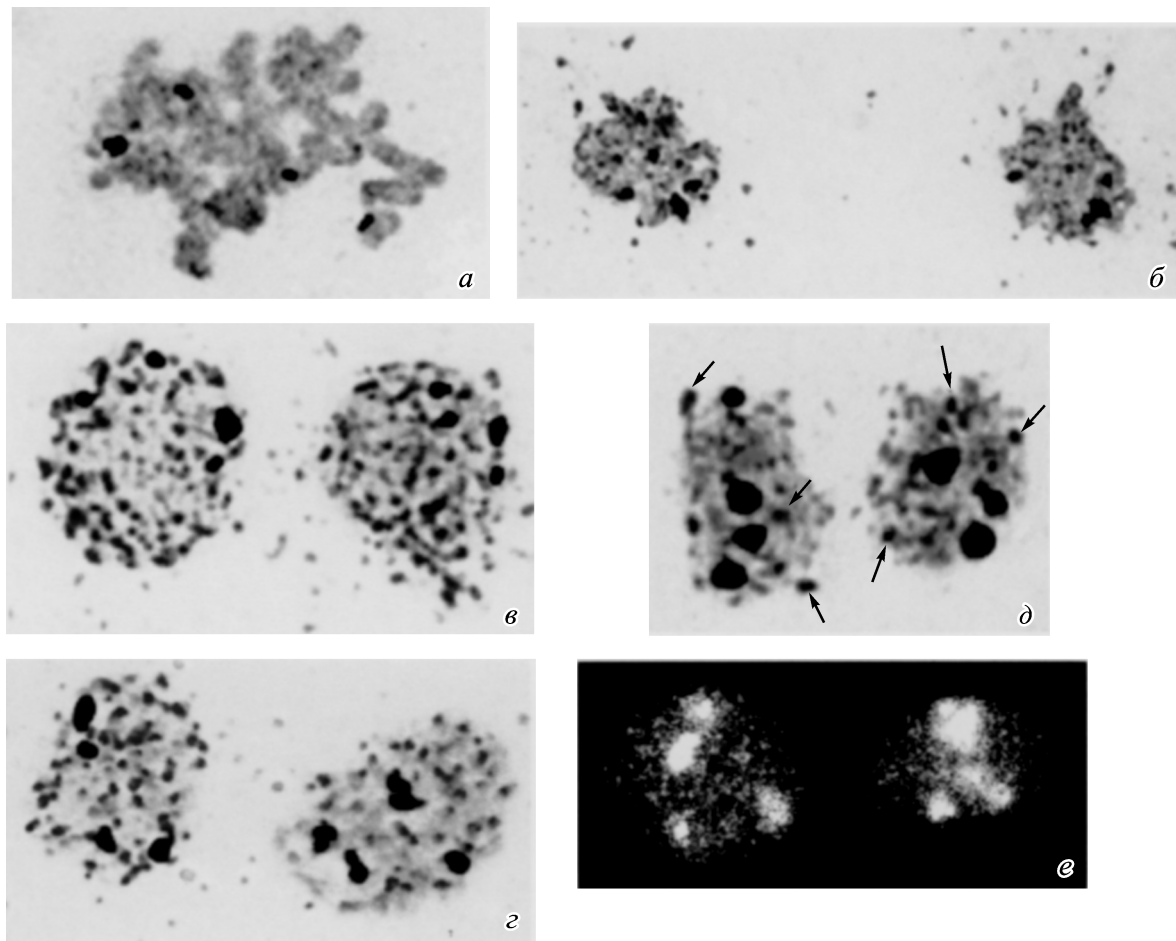


Рис. 5. Метафазная (а), анафазная (б) и раннетелофазные (в—е) клетки на двухмерном (2D) препарате клеток СПЭВ, полученном без применения гипотонии.

а—д — мелкие гранулы в цитоплазме — тельца NDF (nucleolus-derived foci), светло-серые ядерные структуры — конденсаты хроматина, черные зоны — Ag⁺-ЯОР, темно-серые ядерные включения — тельца PNB (prenucleolar bodies) (д, стрелки); в—г — равное (4 : 4) распределение Ag⁺-ЯОР в дочерние ядра или хромосомные наборы; д — неравное (4 : 3) распределение Ag⁺-ЯОР в дочерние ядра; е — предполагаемый случай неравного (4 : 3) распределения активных локусов рДНК в дочерние ядра: левое ядро содержит три ярких сигнала рДНК-FISH, которые по размерам и конфигурации очень похожи на раннетелофазные Ag⁺-ЯОР (активные локусы рДНК), и один тусклый линейный сигнал, который, скорее всего, представляет собой инактивированный локус рДНК (Ag-негативный ЯОР). Окраска азотнокислым серебром (а—д) и методом 2D FISH с пробой 28S + 18S рДНК норки (е). Масштабная линейка — 5 мкм.

Fig. 5. Metaphase (a), anaphase (b) and early telophase (в—e) cells on two-dimensional (2D) preparations of PK cells obtained without hypotonic treatment.

а—д — small granules in the cytoplasm are nucleolus-derived foci (NDF); light grey nuclear structures are chromatin condensations, black domains are Ag⁺-NORs; dark grey nuclear inclusions are prenucleolar bodies (PNB) (d, arrows); в—г — equal (4 : 4) distribution of Ag⁺-NORs in daughter nuclei or chromosome sets; д — unequal (4 : 3) distribution of Ag⁺-NORs in daughter nuclei; е — putative unequal (4 : 3) distribution of active rDNA loci in daughter nuclei: right nucleus contains three bright rDNA-FISH signals looking like typical early telophase Ag⁺-NORs (active rDNA loci) according to their size and shape, in addition to one slight linear signal that is most probably representing an inactive rDNA locus (Ag-negative NOR). Staining with silver nitrate (а—d) and by 2D FISH method with 28S + 18S mink rDNA probe (e). Scale bar — 5 μm.

кариотипы 1, 3, хромосомы 10_s, 8а). Повышенная частота хроматидных разрывов по этой структуре скорее всего указывает на присутствие гетерохроматиновых вставок в ЯОР хромосом 8а и 10_s.

Разграничение Ag⁺-ЯОР сестринских хроматид не представляло методических сложностей, за исключением хромосомы 8а. В этом случае Ag⁺-ЯОР разделяли на Ag⁺-хроматиды по условной линии, которая соединяла центральные участки обрывающейся на нем межхроматидной щели. На основании проведенных измерений определяли отношение площади большего к площади меньшего Ag⁺-ЯОР хроматиды, которое вычисляли для индивидуальных хромосом. Гистограммы распределе-

ния этого отношения в выборках разных ЯОР-хромосом представлены на рис. 3, б. На приведенной гистограмме видно, что данные для разных хромосом перекрываются. По размаху изменчивости отношения площадей Ag⁺-ЯОР сестринских хроматид ЯОР-хромосомы распределяются следующим образом: 8а < 10_s < 10_L < 8. Наибольшие значения этого отношения для хромосом 8 и 10_L составляли 5.1 и 3.4, для хромосом 10_s и 8а — 2.3 и 1.6 соответственно. Общий уровень гетероморфизма хроматид в выборках ЯОР-хромосом оценивали следующим образом. В выборках хромосом 8, 10_L и 10_s за гетероморфные принимали хромосомы с отношением площадей Ag⁺-ЯОР хроматид, равным 1.25 и выше. В случае

хромосомы 8а этот порог повысили до 1.33 в связи с меньшей точностью определения границ Ag⁺-ЯОР сестринских хроматид. В изученных выборках было найдено следующее число случаев гетероморфизма по размеру Ag⁺-ЯОР сестринских хроматид: для хромосомы 8а — 3 (22.5 % от общего числа хромосом), для хромосомы 8 — 14 (73.7 %), для хромосомы 10_L — 10 (58.3 %), для хромосомы 10_S — 8 (57.9 %). Таким образом, изученная разновидность гетероморфизма Ag⁺-ЯОР наименее присуща хромосоме 8а, вдвое чаще и со сходной частотой встречается среди хромосом 10_L и 10_S и втрое чаще среди хромосом 8.

Проведенный анализ гетероморфизма Ag⁺-ЯОР сестринских хроматид показал, что с определенной вероятностью можно ожидать полной редукции зоны аргентофилии на одной из хроматид любой из ЯОР-хромосом набора, за исключением хромосомы 8а. С учетом средних размеров Ag⁺-ЯОР-хромосом появление Ag-негативных ЯОР-хроматид наиболее вероятно в случае хромосом 8 и 10_S. Такое заключение отчасти подтверждается существованием кариотипов с тремя Ag⁺-ЯОР-хромосомами, где отсутствует серебрение на одном из гомологов хромосомы 8 или 10_S. Вместе с тем более прямое подтверждение как гетероморфизма Ag⁺-ЯОР сестринских хроматид, так и заключения о возможности конверсии аргентофильного хроматина одной из сестринских хроматид в обычный (Ag-негативный) хроматин было получено при исследовании Ag⁺-ЯОР в анафазе или в ранней телофазе митоза, проведенном на клетках, растянутых без применения гипотонии.

Установлено, что самые мелкие Ag⁺-ЯОР-хроматиды наблюдаются в метафазе (рис. 5, а). Увеличение их размеров начинается в анафазе на фоне продолжающейся конденсации остальных районов хромосом (рис. 5, б). На этапе формирования телофазных ядер Ag⁺-ЯОР хроматид уже заметно превышают по размеру Ag⁺-ЯОР прометафазных хромосом (рис. 5, в). В самом начале телофазы, до появления ядерных телец PNB или заметной редукции числа цитоплазматических телец NDF, размеры Ag⁺-ЯОР хроматид еще более увеличиваются. При этом отмечаются удлинение и продольная сегментация наиболее крупных зон аргентофилии (рис. 5, г). Несколько позже, до полной редукции телец NDF на фоне высокого уровня конденсации хроматиновых фибрилл и появления мелких единичных телец PNB, размер Ag⁺-ЯОР хроматид приближается к таковому в профазе (рис. 5, д). На рис. 5, е приведена картина свечения рДНК-FISH-сигнала в дочерних телофазных ядрах, находящихся примерно на той же стадии, что и ядра на рис. 5, д. Хорошо видно, что домены рДНК близко соответствуют по морфологии и размерам Ag⁺-ЯОР. Все сигналы в левом и три в правом ядре ярко флуоресцируют, при этом наиболее яркое свечение характерно для самого крупного из них. Единственный тусклый сигнал в правом ядре имеет линейную форму. По-видимому, этот фокус флуоресценции соответствует транскрипционно некомпетентному (несеребряющемуся) ЯОР.

Таким образом, картина распределения Ag⁺-ЯОР и рДНК-FISH-сигнала в дочерних раннетелофазных ядрах полностью подтверждает как существование гетероморфизма по размеру Ag⁺-ЯОР сестринских хроматид (рис. 5, б—е), так и конверсию аргентофильного хроматина одной из сестринских хроматид в Ag-негативный хроматин. Указанная конверсия хроматина приводит к изменению соотношения Ag⁺-ЯОР в дочерних ядрах с 4 : 4 на 4 : 3 (рис. 5, д).

Обсуждение

По современным оценкам, относительное число генов рРНК, не активных в транскрипции, в диплоидных клетках эукариот колеблется в пределах 40—95 % (Grummt, 2003). Столь высокий уровень репрессии генов рРНК осуществляется за счет механизмов формирования гетерохроматина, с одной стороны, и модуляции уровня транскрипции в эухроматине — с другой (Grummt, 2003; Grummt, Pikaard, 2003). В экспериментах с использованием поперечных сшивок ДНК с помощью псоралена установлено, что гены рРНК существуют в двух формах: в виде нуклеосомных структур, соответствующих гетерохроматину, и «безнуклеосомных» (точнее, обедненных нуклеосомами) структур, соответствующих эухроматину (Lucchini, Sogo, 1992). Соотношение этих фракций р-хроматина, рассчитанное на индивидуальную интерфазную клетку, представляет собой митотически наследуемый признак и мало зависит от колебаний уровня клеточного синтеза рРНК (Grummt, 2003). Судя по этим данным, изменчивость уровня транскрипции генов рРНК в популяции однотипных клеток определяется преимущественно модуляцией транскрипции эухроматина. Такие представления подтверждаются наблюдениями на препаратах спрэдов р-хроматина дрожжей, изготовленных по методу Миллера, которые демонстрируют разный уровень загрузки Pol I у активных соседних генов (French et al., 2003). С помощью того же подхода на препаратах спрэдов интерфазного р-хроматина, выделенного из клеток дрожжей (Dammann et al., 1995) и млекопитающих (Junéga et al., 1997), показано, что «молчащие» и активные гены рРНК в индивидуальных локусах рДНК чередуются.

Таким образом, по современным представлениям, факультативный, а возможно, и интеркалярный конститутивный гетерохроматин присутствует во всех интерфазных ЯОР эукариотической клетки. Содержание гетерохроматина в р-хроматине интерфазной клетки является, по-видимому, достаточно стабильным признаком, который проходит через митоз. Такая форма наследственной изменчивости, не связанной с изменением первичной последовательности ДНК, называется эпигенетической, а наука, изучающая такие изменения, — эпигенетикой (Holliday, 1987, 2002; Wu, Morris, 2001). Формирование гетерохроматина в локусах рДНК происходит в раннем развитии по эпигенетическому сценарию для наследуемого транскрипционного сайленсинга («глушения»): инициация (нуклеация) → распространение (spreading) → поддержание (Dillon, 2004). Более подробно с данными по гетерохроматизации р-хроматина в эмбриональных клетках мышей можно ознакомиться в соответствующих работах (Santoro, Grummt, 2001; Strohner et al., 2001, 2004; Santoro et al., 2002; Zhou et al., 2002; Grummt, Pikaard, 2003; Nemeth et al., 2004; Li et al., 2005). В кратком изложении модель «глушения» транскрипции в локусе рДНК, излагаемая в этих работах, выглядит следующим образом. На этапе инициации происходит перемещение нуклеосом в область промотора гена рРНК, которое опосредовано фактором терминации транскрипции TTF-I. Последний привлекает АТФ-зависимый комплекс ремоделирования ядрышка NoRC, который найден и в клетках человека. На этапе распространения происходит взаимодействие NoRC с ДНК метилтрансферазами (Dnm1, Dnm3b) и деацетилазой гистонов (HDAC 1), результатом которого являются метилирование ДНК и де-

ацетилирование гистонов. Метилированный промотор теряет способность связывать фактор инициации транскрипции UBF, что останавливает каскад активирования транскрипции. Поддержание инактивированного состояния генов рРНК осуществляется за счет связывания гистона H3, метилированного по лизину в положении 9, с белком гетерохроматина H1, что приводит к конденсации нуклеосомного хроматина до уровня гетерохроматина (Pikaard, Lawrence, 2002; Grummt, Pikaard, 2003; Lawrence, Pikaard, 2004). Нарушение метилирования рДНК, по-видимому, самым неблагоприятным образом сказывается на организме. В качестве примера заболевания человека, сопряженного с недометилированием рДНК, обычно приводят синдром умственной отсталости ATR-X (Gibbons et al., 2000).

Гетерохроматизация рДНК в культивируемых *in vitro* животных клетках, по-видимому, может быть индуцирована по механизму дозовой компенсации, с помощью хромосомных перестроек или геномных мутаций. На такую возможность недвусмысленно указывают данные об одинаковом уровне транскрипции рРНК в клетках цыпленка ди-, три- и тетрасомных по ЯОР-хромосомам (Muscarella et al., 1985, 1987).

Прямых данных о межхромосомном варьировании ЯОР интерфазной клетки млекопитающих по содержанию гетерохроматина нет. Вместе с тем имеются многочисленные косвенные данные, указывающие на эту возможность. Прежде всего к таким данным можно отнести существование в кариотипе человека и приматов так называемых транскрипционно некомпетентных ЯОР. Такие ЯОР не серебрятся в метафазе митоза и не формируют ядрышка в телофазе и ранней интерфазе, по крайней мере вплоть до этапа слияния ядрышек в G₁-фазе клеточного цикла (Roussel et al., 1996; Sirri et al., 2000). Сводки литературы об Ag-негативных ЯОР можно найти в работах (Heliot et al., 2000; Guillen et al., 2004). В ходе выполненного нами исследования удалось показать существование транскрипционно некомпетентных (несеребрящихся) ЯОР хромосом в прометафазном кариотипе и телофазных ядрах клеток перевиваемой линии СПЭВ, произошедшей из эмбриональной почки свиньи. С помощью тщательного анализа посеребрённых высокоразрешенных прометафазных хромосом СПЭВ было установлено, что обе пары ЯОР хромосом в кариотипе СПЭВ являются гетероморфными по размеру Ag⁺-ЯОР. Это позволило в дальнейшем идентифицировать не только хромосомы, но и гомологи ЯОР-хромосом (8a и 8, 10_L и 10_S). В результате этого было показано, что в транскрипционно некомпетентном состоянии в кариотипе СПЭВ может находиться либо гомолог 8, либо гомолог 10_S.

В исследовании, выполненном относительно недавно на ФГА-стимулированных лимфоцитах человека от 18 здоровых доноров, показано, что из пяти пар ЯОР-хромосом человека (13, 14, 15, 21 и 22) в группу хромосом с Ag-негативным ЯОР попадали только хромосомы 15 и 22 (Heliot et al., 2000). Следует отметить, что среди хромосом 13, 14 и 21 с высокой частотой встречались Ag⁺-ЯОР в виде полумесяца или поперечной полосы, тогда как среди хромосом 15 и 22 вовсе не встречалось такого рода серебрения ЯОР, указывающего на возможность когезии сестринских хроматид по этому участку хромосомы. Более того, среди хромосом 15, по утверждению авторов работы, наблюдали несколько случаев серебрения лишь одной из сестринских хроматид. Вместе с тем все ЯОР-хромосомы человека — акро-

центрики, зона аргентофилии у которых расположена в коротком плече хромосомы, непосредственно у центромеры. При такой организации ЯОР-хромосом достаточно сложно утверждать, действительно ли авторы рассматриваемой работы описали гетероморфизм по серебрению сестринских хроматид, а не их перекрут в области ЯОР. У метацентрических и субметацентрических ЯОР-хромосом СПЭВ, где зона аргентофилии к тому же несколько отстоит от центромеры, всегда можно отследить перекручивание сестринских хроматид в области ЯОР. Такое строение ЯОР-хромосом позволило нам однозначно установить, что гетероморфизм по серебрению сестринских хроматид — регулярное явление среди клеток СПЭВ. Было установлено, что Ag-негативное состояние одной из сестринских хроматид, как и транскрипционно некомпетентные ЯОР, встречается либо у гомолога 8, либо у гомолога 10_S. Более того, проведенное нами исследование серебрения ЯОР в дочерних телофазных ядрах позволило доказать, что наличие такого гетероморфизма вполне достаточно для появления клеток с одним Ag-негативным ЯОР. Полученные данные в совокупности указывают на то, что транскрипционно некомпетентное состояние ЯОР может с определенной частотой индуцироваться в поздней интерфазе—профазе митоза путем тотальной гетерохроматизации одной из сестринских хроматид. Очевидно, что существование такого явления, как гетероморфизм по серебрению ЯОР сестринских хроматид, позволяет предположить существование процесса, присущего для ЯОР всех хромосом СПЭВ, который приводит к трансформации аргентофильного р-хроматина в слабо серебящиеся формы р-хроматина неизвестной природы. Решение этой и других поставленных задач в немалой степени зависит от того, какова природа аргентофильного р-хроматина. Надо сказать, что этот вопрос представлялся почти окончательно решенным уже более 20 лет тому назад (Howell, 1982), что привело к появлению громадного числа работ по преимуществу прикладного характера с использованием метода серебрения ЯОР для оценки их функциональной активности в интерфазе. Однако с позиций сегодняшнего дня природа аргентофильного р-хроматина вновь представляется неопределенной, что мы и попытаемся продемонстрировать ниже.

По биохимическим и ультраструктурным данным, ФЦ ядрышек принято считать интерфазными «дубликатами» транскрипционно компетентных ЯОР метафазных хромосом (Goessens, 1984; Челидзе, Зацепина, 1988; Di-Marzio, 2004). ФЦ представляют собой структуры р-хроматина с невысоким содержанием типичных нуклеосом. На этом основании хроматин ФЦ долгое время считали транскрипционно активным. В настоящее время очевидно, однако, что низкое содержание нуклеосом не является препятствием для негативной регуляции транскрипции. При этом репрессия р-хроматина ФЦ может быть как краткосрочной, за счет модуляции транскрипции, так и долгосрочной, за счет гетерохроматизации зоны промоторов генов рРНК по механизму, описанному выше. (Напомним, что этот механизм инициируется перемещением нуклеосом к промотору гена рРНК.) В этой связи ФЦ вполне могут состоять из специфичного для ядрышка факультативного гетерохроматина с пониженным содержанием нуклеосом или содержать такой гетерохроматин в значительном количестве. Если это так, то как гетероморфизм Ag⁺-ЯОР гомологичных хромосом, так и полиморфизм Ag⁺-ЯОР разноименных хромосом набора,

вероятнее всего, будут наследоваться (передаваться через митоз) аналогично факультативному гетерохроматину X-хромосомы млекопитающих.

Наследуемый гетероморфизм и (или) полиморфизм Ag⁺-ЯОР может реализовываться в локусах рДНК как разных, так и одинаковых молекулярных размеров. В случае высокой гетерохроматизированности аргентофильного р-хроматина корреляция между размером Ag⁺-ЯОР в митозе и содержанием эухроматина в данном локусе рДНК на протяжении периода его активности в интерфазе будет отрицательной. Подобную ситуацию можно предполагать в классическом случае реципрокной транслокации у кукурузы, возникшей в результате разрывов по ЯОР (спутничной нити) хромосомы 6 и в хромосоме 9 (McClintock, 1934; цит. по: DiMario, 2004). Кариотип мутантных растений содержал ЯОР-хромосомы 6⁹ и 9⁶ с разной длиной спутничной нити. При этом хромосома 6⁹, содержащая больший, проксимальный фрагмент ЯОР, всегда формировала ядрышко меньшего размера, чем хромосома 9⁶ с меньшим фрагментом ЯОР.

Представлению об аргентофильном р-хроматине ЯОР как о хроматине, по преимуществу неактивном в предшествующей интерфазе, будет соответствовать ситуация локализации активных генов рРНК в ПФК и на границе ПФК с ФЦ. Экспериментальные данные в поддержку этой концепции в настоящий период преобладают (Rašca, 2003; Rašca et al., 2004). Вместе с тем имеются экспериментальные доказательства и в пользу старой концепции о локализации активных генов рРНК преимущественно в ФЦ и на границе ФЦ с ПФК (Cheutin et al., 2002; Ploton et al., 2004). Этой концепции соответствует взгляд на аргентофильный р-хроматин метафазных ЯОР преимущественно как на эухроматин интерфазного ЯОР, который был инактивирован в течение профазы митоза за счет факторов модуляции транскрипции (DiMario, 2004). В таком случае необходимо ожидать наличия положительной связи между размером метафазного Ag⁺-ЯОР и содержанием эухроматина в данном локусе рДНК в период его активности в интерфазе (Roussel, Hernandez-Verdun, 1994; Heliot et al., 2000). По этой концепции, наследуемый гетероморфизм и (или) полиморфизм Ag⁺-ЯОР, 1) чаще всего свидетельствует о существенной разнице по числу генов рРНК между сопоставляемыми локусами рДНК, 2) невозможен для локусов рДНК, сходных по молекулярному размеру и по паттерну конститутивного (нерибосомного) гетерохроматина, располагающегося на флангах ЯОР или существующему в виде вставок в ЯОР (Heliot et al., 2000; Guillen et al., 2004).

Другими свидетельствами в пользу того, что в хроматине серебрищихся митотических ЯОР преобладает эухроматин, считали присутствие в них факторов инициации транскрипции (Pol I, UBF, SL 1 и топоизомеразы I), а также включение в них меченого предшественника транскрипции — бромированного уридинтрифосфата — уже в ана-телофазе митоза (DiMario, 2004). Важным обстоятельством являлось и то, что главными аргентофильными белками метафазного ЯОР предполагали UBF и Pol I. Вместе с тем само по себе наличие факторов инициации транскрипции в хроматине не является значимым показателем транскрипционной активности (Camto-Fonseca et al., 2000). Об этом говорят многочисленные примеры колокализации этих факторов с интерфазным хроматином, неактивным в транскрипции (Scheer, Hock, 1999), а также то, что лишь ничтожная

часть (<2 %) Pol I, выделенной из экстракта клеток, является компетентной в инициации транскрипции в промоторе гена рРНК (Milkereit, Tschochner, 1998). Более того, оказалось, что и белок UBF не является обязательным компонентом р-хроматина метафазных Ag⁺-ЯОР (Bell et al., 1997).

Данные о возобновлении транскрипции рДНК в ана-телофазе митоза, с одной стороны, вроде бы подтверждают гипотезу о наличии активных генов рРНК в метафазных ЯОР. Однако, с другой стороны, уровень этой активности в ранней фазе G₁ остается стабильно низким (Grummt, 2003). Таким образом, эти данные, скорее, свидетельствуют о низкой концентрации активных генов в локусах рДНК в постмитотический период клеточного цикла. С позиций «эухроматиновой» концепции Ag⁺-ЯОР остается совершенно непонятным и функциональное значение постмитотического синтеза пре-рРНК, который не сопровождается формированием рРНК за отсутствием компонентов процессинга в незрелом ядрышке (DiMario, 2004). С точки зрения концепции высокой гетерохроматизированности Ag⁺-ЯОР, такая транскрипция представляется вполне осмысленной, во-первых, как механизм форсированной деконденсации р-хроматина ЯОР, а во-вторых, как резервный механизм транскрипционного «глушения» генов рРНК в деконденсирующемся хроматине.

Связь между транскрипцией с помощью Pol I и транскрипционным сайленсингом является хорошо установленным фактом (Grummt, 2003). Показано, что такая транскрипция совершенно необходима для определения направления распространения «глушения» синтеза РНК в рибосомном гене. Представление об обогащенности эухроматином ЯОР постмитотической клетки плохо согласуется с данными по определению прижизненной динамики флуоресцирующего белка GFP-Pol I, полученными с помощью FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) и компьютерного моделирования (см. обзор: Grummt, 2000). По этим данным, Pol I разбирается после терминации транскрипции, соответственно сборка Pol I каждый раз происходит de novo на этапе инициации транскрипции. Акт инициации транскрипции в рибосомном промоторе осуществляется примерно каждые 1.4 с. При этом пул субъединиц Pol I сохраняется в ядрышке в течение 9—37 с, а весь этап элонгации транскрипции с помощью Pol I занимает не более 2—3 мин.

Известно, что конститутивный и факультативный гетерохроматин политенных интерфазных хромосом двукрылых насекомых в отличие от эухроматина относительно устойчив к деконденсирующему эффекту гипотонии (Жимулев, 1992). Как мы покажем ниже, такое же свойство, скорее всего, присуще аргентофильному р-хроматину метафазных хромосом человека.

Структура Ag⁺-ЯОР метафазных хромосом человека детально изучена с помощью конфокальной микроскопии и электронной томографии (Heliot et al., 1997). Установлено, что метафазный ЯОР, разрыхленный с помощью гипотонической обработки клеток, состоит из Ag⁺-фибрилл диаметром 60—80 нм, которые скручены вокруг несеребрищей осевой структуры хроматиды, имеющей ширину около 250 нм. По размерам Ag⁺-фибриллы ЯОР в точности соответствуют S-фазным хроматидам, которые выявлялись в клетках СНО после их инкубации в изотоническом полиаминном буферном растворе с высоким содержанием ионов калия (Belmont, Bruce, 1994). Для сравнения укажем, что в тех же услови-

ях диаметр G₁-хроматид клеток СНО и базовых хроматиновых фибрилл телофазных и метафазных хромосом клеток дрозофилы линии Кс, а также клеток человека линии HeLa составлял около 130 нм (Belmont et al., 1989; Belmont, Bruce, 1994). Для полноты картины отметим также, что с помощью электронной микроскопии и АФМ (Atomic Force Microscopy) показано, что гипотоническая обработка клеток, используемая для получения препаратов митотических хромосом, индуцирует диссоциацию хроматина до фибрилл диаметром 20—30 нм (Зацепина и др., 1988; Rizzoli et al., 1994; Tamayo et al., 1999; Tamayo, 2003). Высота метафазной хромосомы на суховоздушных препаратах гипотонированных клеток человека по данным АФМ составляет 55—100 нм, а при инкубации тех же хромосом в изотоническом растворе PBS — 300 нм (Tamayo et al., 1999; Tamayo, 2003). Иные параметры имеет, по-видимому, лишь зона серповидного Ag⁺-ЯОР, который был изучен с помощью конфокальной микроскопии (Heliot et al., 1997). В этой работе показано, что в центральной части такого ЯОР имеется гребень, поднимающийся по оси z на высоту не менее 400 нм.

Эти данные, взятые в совокупности, недвусмысленно указывают на то, что аргентофильный р-хроматин ЯОР, который более слабо упакован, чем остальной хроматин митотических хромосом и G₁-хроматин, тем не менее более устойчив к диссоциации в условиях гипотонии.

Еще одно общеизвестное свойство гетерохроматина метафазных и политенных хромосом — когезия сестринских хроматид. Оказалось, что это свойство в высокой степени присуще и инактивированному интерфазному хроматину (Azuara et al., 2003; Azuara, Fisher, 2003). При этом задержка сегрегации сестринских хроматид не зависит от времени репликации такого хроматина в фазе S клеточного цикла. В настоящей работе показано, что хроматин Ag⁺-ЯОР наряду с центромерным гетерохроматином прометафазных хромосом клеток СПЭВ с высокой частотой демонстрирует как когезию сестринских хроматид, так и их скрученность.

Таким образом, на основании полученных и литературных данных мы склоняемся к тому, что аргентофильный р-хроматин клеток СПЭВ представляет собой по преимуществу специфичную для ядрышка форму инактивированного и (или) низкоактивного позднореплицирующегося хроматина.

Авторы выражают искреннюю признательность Т. Паудсепп (Royal Veterinary and Agricultural University, Frederiksberg, Дания) за предоставленную пробу рДНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 02-04-49606).

Список литературы

- Демин С. 1997. Исследование структуры хроматина и хромосом на препаратах дериватов интерфазных ядер, полученных путем удаления оболочек ядер. I. Метод получения препаратов и морфология остаточных ядер лейкоцитов человека и эпителиоцитов кишечника хирономуса. Цитология. 39 (2/3): 253—263.
- Демин С. 1999. Исследование структуры хроматина и хромосом на препаратах дериватов интерфазных ядер, полученных путем удаления оболочек ядер. II. Структура хроматина и ассоциация хромосом в растянутых амебранных ядрах и митотических фигурах. Цитология. 41 (1): 66—86.
- Жимухев И. Ф. 1992. Политенные хромосомы: морфология и структура. Новосибирск: Наука. 480 с.
- Зацепина О. И., Поляков В., Ченцов С. 1988. Дифференциальная деконденсация митотических хромосом при гипотонической обработке клеток как возможна причина G-сегментации. Цитология. 30 (10): 1172—1179.
- Зацепина О. В., Стефанова В. Н. 1993. Особенности ультраструктуры некоторых районов метафазных хромосом свиньи (теломера, центромера, ядрышковый организатор). Цитология. 35 (5): 17—23.
- Мамаева С. Е. 2002. Атлас хромосом постоянных клеточных линий человека и животных. М.: Научный мир. 236 с.
- Сабанеева Е. В. 1989. Специфичность окрашивания ядрышковых организаторов азотнокислым серебром. Цитология. 31 (1): 5—14.
- Челудзе П. В., Зацепина О. В. 1988. Морфофункциональная классификация ядрышек. Успехи соврем. биол. 105 (2): 252—268.
- Azuara V., Brown K. E., Williams R. R., Webb N., Dillon N., Festenstein R., Buckle V., Merkschlager M., Fisher A. G. 2003. Heritable gene silencing in lymphocytes delays chromatid resolution without affecting the timing of DNA replication. Nat. Cell Biol. 5: 668—674.
- Azuara V., Fisher А. 2003. Maintaining transcriptional states through DNA replication. Cell Cycle. 2: 521—524.
- Bell P., Mais C., McStay B., Scheer U. 1997. Association of the nucleolar transcription factor UBF with the transcriptionally inactive rRNA genes of pronuclei and early *Xenopus* embryos. J. Cell Sci. 110: 2053—2063.
- Belmont A. S., Braunfeld M. B., Sedat J. W., Agard D. A. 1989. Large-scale chromatin structural domains within mitotic and interphase chromosomes *in vivo* and *in vitro*. Chromosoma. 98: 129—143.
- Belmont A. S., Bruce K. 1994. Visualization of G1 chromosomes: a folded, twisted, supercoiled chromonema model of interphase chromatid structure. J. Cell Biol. 127: 287—302.
- Carmo-Fonseca M., Mendes-Soares L., Campos I. 2000. To be or not to be in the nucleolus. Nat. Cell Biol. 2: E107—E112.
- Cheutin T., O'Donohue M. F., Beorchia A., Vandelaer M., Kaplan H., Defever B., Ploton D., Thiry M. 2002. Three-dimensional organization of active rRNA genes within the nucleolus. J. Cell Sci. 115: 3297—3307.
- Chowdhary B. P., de la Sena C., Harbitz I., Eriksson L., Gustavsson I. 1995. FISH on metaphase and interphase chromosomes demonstrates the physical order of the genes for GPI, CRC and LIPE in pigs. Cytogenet. Cell Genet. 71: 175—178.
- Christensen K., Brusgaard K., Malchenko S., Lohi O., Sevrov O. 1996. Standardization of the American mink (*Mustella vison*) karyotype and some cosmid *in situ* hybridization results. Arch. Zootec. 45: 259—265.
- Claussen U., Michel S., Muhlig P., Westermann M., Grummt U. W., Kromeyer-Hauschild K., Liehr T. 2002. Demystifying chromosome preparation and the implications for the concept of chromosome condensation during mitosis. Cytogenet. Genome Res. 98: 136—146.
- Czaker R., Mayr B. 1980. Detection of nucleolus organizer regions (NOR) in the chromosome of the domestic pig (*Sus scrofa domestica*). Experientia. 36: 1356—1357.
- Dammann R., Lucchini R., Koller T., Sogo J. M. 1995. Transcription in the yeast rRNA gene locus: distribution of the active gene copies and chromatin structure of their flanking regulatory sequences. Mol. Cell. Biol. 15: 5294—5303.
- Dillon N. 2004. Heterochromatin structure and function. Biol. Cell. 96: 631—637.
- DiMario P. J. 2004. Cell and molecular biology of nucleolar assembly and disassembly. Int. Rev. Cytol. 239: 99—178.
- French S. L., Osheim Y. N., Cioci F., Nomura M., Beyer A. L. 2003. In exponentially growing *Saccharomyces cerevisiae* cells, rRNA synthesis is determined by the summed RNA polymerase I loading rate rather than by the number of active genes. Mol. Cell. Biol. 23: 1558—1568.

- Gebrane-Younes J., Fomproix N., Hernandez-Verdun D. 1997. When rDNA transcription is arrested during mitosis, UBF is still associated with non-condensed rDNA. *J. Cell Sci.* 110 : 2429—2440.
- Gibbons R. J., McDowell T. L., Raman S., O'Rourke D. M., Garrick D., Ayyub H., Higgs D. R. 2000. Mutations in ATRX, encoding a SWI/SNF-like protein, cause diverse changes in the pattern of DNA methylation. *Nat. Genet.* 24 : 368—371.
- Goessens G. 1984. Nucleolar structure. *Int. Rev. Cytol.* 87 : 107—158.
- Grummt I. 2003. Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes. Develop.* 17 : 1691—1702.
- Grummt I., Pikaard C. S. 2003. Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4 : 641—649.
- Guillen A. K., Hirai Y., Tanoue T., Hirai H. 2004. Transcriptional repression mechanisms of nucleolus organizer regions (NORs) in humans and chimpanzees. *Chromosome Res.* 12 : 225—237.
- Haaf T., Schmid M. 1991. Chromosome topology in mammalian interphase nuclei. *Exp. Cell Res.* 192 : 325—332.
- Hadjiolov A. A. 1985. Ribosomal genes. In: *The nucleolus and ribosome biogenesis*. Wien: Springer-Verlag. 5—51.
- Heliot L., Kaplan H., Lucas L., Klein C., Beorchia A., Do-co-Fenzy M., Menager M., Thiry M., O'Donohue M. F., Ploton D. 1997. Electron tomography of metaphase nucleolar organizer regions: evidence for a twisted-loop organization. *Mol. Biol. Cell.* 8 : 2199—2216.
- Heliot L., Mongelard F., Klein C., O'Donohue M. F., Chasseiry J. M., Robert-Nicoud M., Usson Y. 2000. Nonrandom distribution of metaphase AgNOR staining patterns on human acrocentric chromosomes. *J. Histochem. Cytochem.* 48 : 13—20.
- Hernandez-Verdun D. 1986. Structural organization of the nucleolus in mammalian cells. *Methods Achiev. Exp. Pathol.* 12 : 26—62.
- Hernandez-Verdun D., Roussel P. 2003. Regulators of nucleolar functions. *Prog. Cell Cycle Res.* 5 : 301—308.
- Holliday R. 1987. The inheritance of epigenetic defects. *Science.* 238 : 163—170.
- Holliday R. 2002. Epigenetic comes of age in the twenty-first century. *J. Genet.* 81 : 1—4.
- Howell W. 1982. Selective staining of nucleolar organizer regions (NORs). In: *The cell nucleus*. New York: Acad. Press. 9 : 89—142.
- Howell W. M., Black D. A. 1980. Controlled silver staining of nucleolar organizer regions with a protective colloidal developer: 1-step method. *Experientia.* 36 : 1014—1016.
- Hozak P., Zatssepina O., Vasilyeva I., Chentsov Y. 1986. An electron microscopic study of nucleolar-organizing regions at some stages of the cell cycle (G₀ period, G₂ period, mitosis). *Biol. Cell.* 57 : 197—205.
- Hsu T. C., Spirito S. E., Pardue M. L. 1975. Distribution of 18 + 28S ribosomal genes in mammalian genomes. *Chromosoma.* 53 : 25—36.
- Junera H. R., Masson C., Geraud G., Suja J., Hernandez-Verdun D. 1997. Involvement of *in situ* conformation of ribosomal genes and selective distribution of upstream binding factor in rRNA transcription. *Mol. Biol. Cell.* 8 : 145—156.
- Kawasaki K., Minoshima S., Kudoh J., Fukuyama R., Shimizu N. 1992. Methylation status of ribosomal RNA gene clusters in the flow-sorted human acrocentric chromosomes. *Mamm. Genome.* 3 : 173—178.
- Lawrence R. J., Pikaard C. S. 2004. Chromatin turn ons and turn offs of ribosomal RNA genes. *Cell Cycle.* 3 : 880—883.
- Lemke J., Claussen J., Michel S., Chudoba I., Muhlig P., Westermann M., Sperling K., Rubtsov N., Grummt U. W., Ulmann P. et al. 2002. The DNA-based structure of human chromosome 5 in interphase. *Amer. J. Hum. Genet.* 71 : 1051—1059.
- Li J., Santoro R., Koberna K., Grummt I. 2005. The chromatin remodeling complex NoRC controls replication timing of rRNA genes. *EMBO J.* 24 : 120—127.
- Lucchini R., Sogo J. M. 1992. Different chromatin structures along spacers flanking active and inactive *Xenopus* rRNA genes. *Mol. Cell. Biol.* 12 : 4288—4296.
- Matsui S., Sandberg A. A. 1985. Intranuclear compartmentalization of DNA-dependent RNA polymerases: association of RNA polymerase I with nucleolar organizing chromosomes. *Chromosoma.* 92 : 1—6.
- Milkereit P., Tschochner H. 1998. A specialized form of RNA synthesis is disrupted during transcription. *EMBO J.* 17 : 3692—3703.
- Muscarella D. E., Vogt V. M., Bloom S. E. 1985. The ribosomal RNA gene cluster in aneuploid chickens: evidence for increased gene dosage and regulation of gene expression. *J. Cell Biol.* 101 (5, Pt 1) : 1749—1756.
- Muscarella D. E., Vogt V. M., Bloom S. E. 1987. Characterization of ribosomal RNA synthesis in a gene dosage mutant: the relationship of topoisomerase I and chromatin structure to transcriptional activity. *J. Cell Biol.* 105 : 1501—1513.
- Nemeth A., Strohn R., Grummt I., Langst G. 2004. The chromatin remodeling complex NoRC TTF-I cooperate in the regulation of the mammalian rRNA genes *in vivo*. *Nucl. Acids Res.* 32 : 4091—4099.
- Olson M. O., Hingorani K., Szebeni A. 2002. Conventional and nonconventional roles of the nucleolus. *Int. Rev. Cytol.* 219 : 199—266.
- Pikaard C. S., Lawrence R. J. 2002. Uniting the paths to gene silencing. *Nat. Genet.* 32 : 340—341.
- Ploton D., O'Donohue M. F., Cheutin T., Beorchia A., Kaplan H., Thiry M. 2004. Three-dimensional organization of rDNA and transcription. In: *The nucleolus*. New York: Kluwer Acad. Plenum Publ. : 156—172.
- Raska I. 2003. Oldies but goldies: searching for Christmas trees within the nucleolar architecture. *Trends Cell Biol.* 13 : 517—525.
- Raska I., Dunder M., Koberna K., Melcak I., Risueno M. C., Torok I. 1995. Does the synthesis of ribosomal RNA take place within nucleolar fibrillar centers or dense fibrillar components? A critical appraisal. *J. Struct. Biol.* 114 : 1—22.
- Raska I., Koberna K., Malinsky J., Fidlerova H., Masata M. 2004. The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biol. Cell.* 96 : 579—594.
- Rizzoli R., Rizzi E., Falconi M., Galanzi A., Baratta B., Lattanzi G., Vitale M., Mazzotti G., Manzoli L. 1994. High resolution detection of uncoated metaphase chromosomes by means of field emission scanning electron microscopy. *Chromosoma.* 103 : 393—400.
- Robert-Fortel I., Junera H. R., Geraud G., Hernandez-Verdun D. 1993. Three-dimensional organization of the ribosomal genes and Ag-NOR proteins during interphase and mitosis in PtK1 cells studied by confocal microscopy. *Chromosoma.* 102 : 146—157.
- Roussel P., Andre C., Comai L., Hernandez-Verdun D. 1996. The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in active NORs and absent in inactive NORs. *J. Cell Biol.* 133 : 235—246.
- Roussel P., Hernandez-Verdun D. 1994. Identification of Ag-NOR proteins, markers of proliferation related to ribosomal gene activity. *Exp. Cell Res.* 214 : 465—472.
- Sakai K., Ohta T., Minoshima S., Kudoh J., Wang Y., de Jong P. J., Shimizu N. 1995. Human ribosomal RNA gene cluster: identification of the proximal end containing a novel tandem repeat sequence. *Genomics.* 26 : 521—526.
- Santoro R., Grummt I. 2001. Molecular mechanisms mediating methylation-dependent silencing of ribosomal gene transcription. *Mol. Cell.* 8 : 719—725.
- Santoro R., Li J., Grummt I. 2002. The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription. *Nat. Genet.* 32 : 393—396.
- Scheer U., Hock R. 1999. Structure and function of the nucleolus. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11 : 385—390.
- Scheer U., Rose K. M. 1984. Localization of RNA polymerase I in interphase cells and mitotic chromosomes by light and electron microscopic immunocytochemistry. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 81 : 1431—1435.
- Sirri V., Roussel P., Hernandez-Verdun D. 2000. The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. *Micron.* 31 : 121—126.

Srivastava A. K., Hagino Y., Schlessinger D. 1993. Ribosomal DNA clusters in pulsed-field gel electrophoretic analysis of human acrocentric chromosomes. *Mamm. Genome.* 4 : 445—450.

Stefanova V. N. 1990. Characterization of the pig kidney (PK) cell line using differential banding techniques. In: Abstr. of the 9th Eur. colloquium on cytogenetics of domestic animals; 7—13 July; Toulouse—Auzeville. 41.

Strohner R., Nemeth A., Jansa P., Hofmann-Rohrer U., Santoro R., Langst G., Grummt I. 2001. NoRC — a novel member of mammalian ISWI-containing chromatin remodeling machines. *EMBO J.* 20 : 4892—4900.

Strohner R., Nemeth A., Nightingale K. P., Grummt I., Becker P. B., Langst G. 2004. Recruitment of the nucleolar remodeling complex NoRC establishes ribosomal DNA silencing in chromatin. *Mol. Cell. Biol.* 24 : 1791—1798.

Suja J. A., Gebrane-Younes J., Geraud G., Hernandez-Verdun D. 1997. Relative distribution of rDNA and proteins of the RNA polymerase I transcription machinery at chromosomal NORs. *Chromosoma.* 105 : 459—469.

Sylvester J. E., Gonzalez I. L., Mougey E. B. 2004. Structure and organization of vertebrate ribosomal RNA genes. In: *The nucleolus.* New York: Kluwer Acad. Plenum Publ. 58—73.

Tamayo J. 2003. Structure of human chromosomes studies by atomic force microscopy. *J. Struct. Biol.* 141 : 198—207.

Tamayo J., Miles M., Thein A., Soothill P. 199. Selective cleaning of the cell debris in human chromosome preparations studied by scanning force microscopy. *J. Struct. Biol.* 128 : 200—210.

Thiry M., Goessens G. 1996. The nucleolus during the cell cycle. New York: Hong Kong, Austin, Tex., Springer; R. G. Landes Comp. 146 p.

Weisenberger D., Scheer U. 1995. A possible mechanism for the inhibition of ribosomal RNA gene transcription during mitosis. *J. Cell Biol.* 129 : 561—575.

Worton R. G., Sutherland J., Sylvester J. E., Willard H. F., Bodrug S., Dube I., Duff C., Kean V., Ray P. N., Schmickel R. D. 1988. Human ribosomal RNA genes: orientation of the tandem array and conservation of the 5' end. *Science.* 239 : 64—68.

Wu C., Morris J. R. 2001. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science.* 293 : 1103—1105.

Zhou Y., Santoro R., Grummt I. 2002. The chromatin remodeling complex NoRC targets HDAC1 to the ribosomal gene promoter and represses RNA polymerase I transcription. *EMBO J.* 21 : 4632—4640.

Поступила 24 V 2005

MITOTIC TRANSMISSION OF RIBOSOMAL CHROMATIN IN EMBRYONIC PIG KIDNEY CELLS (PK CELL LINE)

V. N. Stefanova,^{1, 2} S. Yu. Demin²

¹ All-Russian Institute of Genetics and Farm Animal Breeding, RAA, St. Petersburg—Pushkin, and ² Institute of Cytology, RAS, St. Petersburg;
¹ e-mail: vestefan@mail.ru

Mammalian nucleolar organizers (NORs) contain ribosomal (rRNA) genes associated with argyrophilic proteins and can be specifically stained by silver. These genes are clustered in four loci of PK meta- and submetacentric chromosomes 8 and 10. According to our data reported elsewhere, one of PK NORs contains a large amplification of rRNA that is manifested on silver stained chromosomes as abnormally large Ag⁺-NOR 8a. It is proposed that such a redundancy of rRNA genes induced their dose compensation in the form of transcriptional silencing, triggering the rise of Ag-negative ribosomal chromatin. To test this assumption, we carried out a morphometrical analysis of Ag⁺-NOR (bearing) chromosomes from prometaphase sets with modal chromosome number. We found that in the individual chromosome set a longer homologue 10_L of chromosome 10 had always a larger Ag⁺-NOR area than did a shorter homologue 10_S. Thus, PK karyotype consists of two pairs of heteromorphous Ag⁺-NORs: 8a and 8, 10_L and 10_S. One half of tested chromosome sets revealed four Ag⁺-NOR chromosomes, the other half had one Ag-negative NOR nearly equally belonging to chromosome either 8 or 10_S. The majority of prometaphase Ag⁺-NORs showed partial or full chromatid splitting that allows for Ag⁺-NOR area measurements of (sister) chromatid. The area ratio of larger to smaller chromatid Ag⁺-NOR strongly varied for all chromosomes except chromosomes 8a. The maximum value of this ratio reached 5.1 for chromosome 8 and 3.4, and 2.3 — for 10_L and 10_S (vs. 1.6 for 8a). Proportions of chromosomes with the ratio 1.25 and more, were: near two thirds — among chromosomes 8, near half — among 10_L and 10_S, but less than a quarter — among chromosomes 8a. These findings show that progressive differentiation of sister chromatid NORs in regard of the content of Ag-negative ribosomal chromatin may lead to an unequal Ag⁺-NOR distribution between daughter cells. To test this prediction, we developed a new technique for obtaining two dimensional (2D) preparations of stretched PK cells, which makes it possible to avoid the stage of hypotonic treatment of living cells, since this treatment levels the silver staining of NORs and prenucleolar bodies of fixed telophase cells. We found that some daughter nuclei from early telophase cells revealed the value of Ag⁺-NOR separation equal to 4 : 3 instead of the common value equal to 4 : 4. Complimentary 2D FISH with 28S + 18S mink rDNA probe showed that early telophase rRNA loci, detected as four bright large spots, are close by area and shape to Ag⁺-NORs of the corresponding cells. Sometimes, however, one of the daughter nuclei showed three such domains, in addition to one slight linear FISH signal that most probably represented Ag-negative NOR. A delayed separation of sister chromatids is the main structural characteristic of inactive chromatin (Azucara et al., 2003). It was established that the largest PK Ag⁺-NOR (chromosome 8a) showed a high level of cohesion and (or) twisting of sister chromatids that is characteristic of prophase rather than prometaphase PK chromosomes. These findings, together with the above cited literature data, give evidence for enrichment of Ag⁺-NOR by either inactive or (and) low active late-replicating chromatin.