

ДИНАМИКА И МЕХАНИЗМЫ РЕОРГАНИЗАЦИИ ЯДРЫШКА В МИТОЗЕ

© О. О. Жарская,¹ О. В. Зацепина^{2,*}

¹ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета и ² Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва;

^{2,*} электронный адрес: zatsepin@ibch.ru

Ядрышко — наиболее крупный домен клеточного ядра, присутствующий в подавляющем большинстве клеток эукариот. Его основной и универсальной функцией является синтез рибосом, включая транскрипцию рДНК, созревание транскриптов пре-рРНК и сборку рибосомных частиц. Кроме того, согласно данным последних лет, ядрышко и его белки принимают участие в регуляции клеточного цикла, апоптоза и старения. Эти функции осуществляются ядрышком главным образом на стадии интерфазы и блокируются при митотическом делении клеток, когда ядрышко распадается. В настоящем обзоре рассматриваются современные данные о динамике и механизмах, регулирующих распад и реформирование ядрышка в митозе. Особое внимание уделяется сведениям, полученным путем анализа динамики ядрышка в живых клетках, а также моделированию преждевременной сборки ядрышка в результате различных экспериментальных воздействий.

Ключевые слова: ядрышко, митоз, механизмы распада и сборки, перихромосомный слой, проядрышки, цитоплазматические ядрышковые дериваты, методы анализа.

Принятые сокращения: ГК — гранулярный компонент, мякРНК — малые ядрышковые РНК, пре-рРНК — 47-45S предшественник рРНК, ПФК — плотный фибриллярный компонент, ПХМ — периферический хромосомный материал, рДНК — рибосомная ДНК, рРНК — рибосомная РНК, ФЦ — фибриллярные центры, ЦЯД — цитоплазматические ядрышковые дериваты, ЯО-хромосомы — ядрышкообразующие хромосомы, ЯОР — ядрышкообразующие районы хромосом, APC/C (anaphase-promoting complex) — комплекс, стимулирующий анафазу (циклосома), Cdk 1 (cyclin-dependent kinase 1) — циклин В-зависимая киназа 1, GFP (green fluorescent protein) — зеленый флуоресцирующий белок.

Ядрышко — эволюционно-консервативный и наиболее крупный (1—5 мкм) структурный домен клеточного ядра, который принято называть «фабрикой рибосом» (Hadjiolov, 1985; Olson, 2002; Andersen et al., 2005). У высших эукариот ядрышки формируются вокруг кластеров тандемно повторенных рибосомных генов (рДНК), кодирующих 18S, 5.8S и 28S рРНК, которые транскрибируются РНК-полимеразой I в виде единого предшественника — 47-45S пре-рРНК. Кластеры рДНК занимают определенные районы в некоторых хромосомах кариотипа, получивших название «ядрышкообразующих хромосом» (ЯО-хромосом), а участки хромосом, занимаемые рибосомными генами, — «ядрышкообразующими районами» (ЯОР) или «ядрышковыми организаторами» (ЯО). Число ЯО-хромосом определяет общее число ядрышек в клетках в интерфазе, так что при увеличении числа ЯО-хромосом число ядрышек в клетках увеличивается. Однако в подавляющем большинстве типов клеток число ядрышек оказывается меньше числа ЯО-хромосом, что связано с двумя основными причинами: во-первых, не все ЯОР могут быть активны в интерфазе, а во-вторых, ядрышки в ядрах имеют ярко выраженную тенденцию к слиянию. В отличие от рДНК гены 5S рРНК транскрибируются РНК-полимеразой III, не входят в состав ЯОР в митозе и, как правило, располагаются вне территории ядрышка в интерфазе (Mosgoeller, 2004).

Как известно, образование рибосом в ядрышке включает в себя три основных этапа: транскрипция рДНК, созревание новообразованных транскриптов пре-рРНК и сборка рибосомных частиц. Тонкие механизмы регуляции каждого из этих этапов до сих пор не выяснены, но установлено, что транскрипция одного повтора рДНК в клетках млекопитающих занимает около 7—10 мин, а на созревание малой и большой субъединиц рибосом требуется 15—30 и 20—40 мин соответственно (Hadjiolov, 1985). Процессинг пре-рРНК включает в себя удаление и деградацию транскрибируемых спейсерных участков, химические модификации рРНК (главным образом метилирование и псевдоуридилрование) и начинается до завершения процесса транскрипции. В процессинге пре-рРНК ключевую роль играют U3, U8 и U13 мякРНК, формирующие прочные комплексы с регуляторными белками в составе малых ядрышковых РНП (мякРНП).

Согласно последним данным масс-спектрометрии, выделенные ядрышки клеток человека HeLa содержат около 700 белков (Andersen et al., 2005), однако лишь некоторые из них изучены с точки зрения значимости для биогенеза рибосом или других процессов, протекающих с участием ядрышка. К таким белкам относятся, в частности, компоненты транскрипционного комплекса рДНК—РНК-полимераза I и ее специфический кофактор UBF, основной белок мякРНП фибрилларин, который

обеспечивает ранний процессинг и метилирование пре-рРНК, основной фактор сборки рибосомных частиц V23 (называемый также нуклеофозмином 1, ньюматрином или NO38). К хорошо изученным белкам интерфазного ядрышка относится также C23 (нуклеолин), участвующий как в транскрипции рДНК, так и в сборке рибосом (Andersen et al., 2005). Кроме того, за последние годы получены убедительные доказательства того, что многие специфические белки ядрышка, необходимые для образования рибосом, вовлечены также в регуляцию других процессов, включая клеточный цикл, апоптоз, созревание мРНК и старение (Olson et al., 2002). Эти наблюдения позволяют говорить о многофункциональности ядрышка и его основных белков.

Хорошо известно, что у высших эукариот ядрышко присутствует в клетках преимущественно на стадии интерфазы и временно разбирается при митозе. Очевидно, что «сбои» в сборке ядрышка на завершающих стадиях митоза будут неблагоприятным образом сказываться на его функциональном состоянии в последующей интерфазе и могут служить причиной гибели клеток. В настоящем обзоре рассматриваются современные данные о структуре ядрышка в интерфазных и митотических клетках животных и растений. Особое внимание уделено судьбе молекулярных компонентов ядрышка (включая белки, мРНК и рРНК) во время его распада и сборки, а также механизм, регулирующим изменения ядрышка при делении клеток.

Общие принципы организации ядрышка в интерфазе

В активных интерфазных ядрышках методами электронной микроскопии различают три основных структурных субдомена: фибриллярные центры (ФЦ), плотный фибриллярный компонент (ПФК) и гранулярный компартмент (ГК), называемый также гранулярной частью (Mosgoeller, 2004; Thiry, Lafontaine, 2005). На ультратонких срезах ФЦ выглядят как округлые скопления тонкого фибриллярного материала (диаметром около 7 нм),

обладающего низкой электронной плотностью; число ФЦ прямо коррелирует с уровнем транскрипции рДНК. ПФК также образован фибриллярным материалом, но плотность его упаковки значительно превышает таковую в ФЦ. В активных ядрышках многих, хотя и не всех, типов клеток ПФК располагается на поверхности ФЦ, объединяя ФЦ в группы — фибриллярные комплексы, число которых соответствует числу активных ЯО-хромосом (Goessens, 1984; Zatsepina et al., 1988; Зацепина и др., 1989а, 1989б; Челидзе, Зацепина, 1989). ГК ядрышка резко отличается по морфологии от фибриллярной части ядрышка, поскольку он образован гранулами диаметром около 20 нм и в пролиферирующих клетках занимает основной объем ядрышка (Hajiolov, 1985; Mosgoeller, 2004) (рис. 1).

Многолетняя дискуссия о местах транскрипции рибосомных генов привела к заключению о том, что этот процесс осуществляется главным образом на границе между ФЦ и ПФК. ПФК соответствует району ядрышка, где осуществляются созревание транскриптов пре-рРНК и деградация ее спейсерных участков (Smarko et al., 2000; Cheutin et al., 2002; Huang, 2002; Koberna et al., 2002; Raska et al., 2004; Guillot et al., 2005). ГК служит для терминальных стадий сборки рибосомных частиц и их подготовки к экспорту в нуклеоплазму и цитоплазму (Sollner-Webb et al., 1996; Lafontaine, Tollervey, 2001; Fatica, Tollervey, 2002; Grandi et al., 2002; Fromont-Racine et al., 2003; Tschochner, Hurt, 2003; Nazar, 2004) (рис. 1). Помимо структурных особенностей каждый из основных компонентов ядрышка характеризуется наличием специфических белков, являющихся их иммуноцитохимическими маркерами. Так, основной пул РНК-полимеразы I и UBF находится внутри ФЦ (Scheer, Rose, 1984), основным белковым маркером ПФЦ принято считать фибрилларин, а маркерами гранулярной части ядрышка — белки V23 (нуклеофозмин), C23 (нуклеолин) и Nop52 (Savino et al., 1999).

Ядрышки относятся к одним из наиболее пластичных компонентов клеточного ядра, организация и функциональная активность которых изменяются в ответ на многие внешние воздействия (Cheutin et al., 2004). Так,

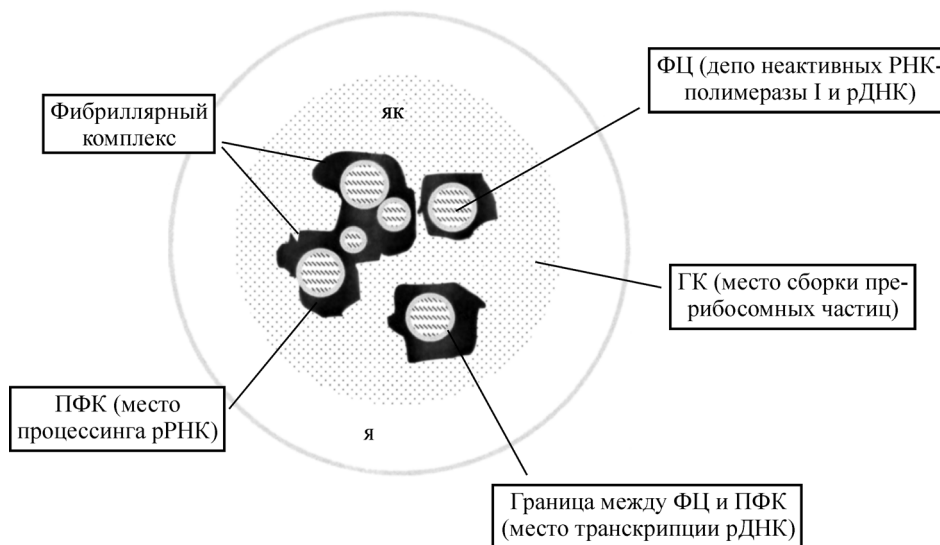


Рис. 1. Общая схема структурно-функциональной организации ядрышка в клетках высших эукариот.

я — ядро, як — ядрышко, ФЦ — фибриллярные центры, ПФК — плотный фибриллярный компонент, ГК — гранулярный компартмент.

состояние ядрышек быстро изменяется при истощении культуральной среды ростовыми факторами, при подавлении транскрипции рДНК (например, актиномицином Д), ингибировании казеин-киназы 2 (ДРБ, 5,6-дихлоро-1-β-Д-рибофуранозилбензимидазолом) и циклин-зависимых киназ (росковитином), а также в ответ на обработку клеток соединениями тяжелых металлов (например, хлоридом ртути). Изменения ядрышек проявляются также под влиянием многих физических факторов, включая облучение ультрафиолетом, действие теплового шока или растворов низкой ионной силы (Zatsepina et al., 1997a, 1997b; Rubbi, Milner, 2003). Существенно, что ответ ядрышка на эти воздействия является специфическим. Так, ингибирование транскрипции рДНК приводит к сжатию ядрышек, пространственной сегрегации ФЦ, ПФК и ГК и сопровождается миграцией белка B23 (нуклеофозмина) в нуклеоплазму (Fan, Penman, 1971; Phillips, 1972; Zatsepina et al., 1997a). Обработка клеток ДРБ приводит к «разворачиванию» ядрышек и формированию протяженных структур, подобных ожерелью и образованным цепочками ФЦ, общее число которых оказывается близким к числу генов рРНК (Scheer et al., 1984; Granick, 1975a, 1975b; Tamm et al., 1976; Le Panse et al., 1999; Louvet et al., 2005).

Кроме того, структура ядрышек подвергается некоторым, а иногда и очень заметным перестройкам в динамике клеточного цикла. Наиболее заметные изменения происходят с ядрышками при выходе клеток в состояние пролиферативного покоя, когда ядрышки инактивируются, уменьшаются в размерах, обедняются гранулярным компонентом, но содержат увеличенные ФЦ (Jordan, McGovern, 1981; Zatsepina et al., 1988; Cheutin et al., 2004). Многократно описывались также морфологические различия ядрышек в клетках разных типов одного организма, хотя причины этого полиморфизма до сих пор остаются неизвестными (Smetana, Busch, 1974; Челидзе, Зацепина, 1989). Однако в естественных условиях наиболее значительным структурным и функциональным перестройкам ядрышки подвергаются при делении клеток путем митоза.

Распад ядрышка в профазе и прометафазе митоза

Митоз — универсальный и наиболее распространенный способ репродукции животных и растительных клеток с продолжительностью около 1—2 ч, которая у клеток, способных к пролиферации, соответствует приблизительно десятой доле продолжительности всего клеточного цикла (Епифанова, 2003). В зависимости от состояния хромосом процесс митоза принято разделять на несколько основных фаз — профазу, прометафазу, метафазу, анафазу и телофазу, хотя четкие границы между следующими друг за другом стадиями митоза как в живых, так и в фиксированных клетках провести достаточно трудно. Исключение составляют зрелая метафаза (которая характеризуется полностью сформированной и расположенной в экваториальной плоскости клетки пластинкой хромосом) и переход между метафазой и анафазой, сопровождающийся четким пространственным разделением дочерних наборов хромосом.

Первые морфологические изменения ядрышка выявляются в профазе митоза одновременно с началом конденсации хромосом. На светооптическом уровне эти изменения сопровождаются уменьшением оптической

плотности ядрышка и обычно описываются как «таяние ядрышка». На ультраструктурном уровне «таяние ядрышка» проявляется в объединении и укрупнении ФЦ, частичном исчезновении ПФК и разрыхлении ГК (Hozak et al., 1986; Hernandez-Verdun, 2004). Принято считать, что изменение морфологии ядрышка в профазе является следствием постепенного прекращения синтеза (Scheer, Hock, 1999; Olson et al., 2002) и процессинга рРНК (Fan, Penman, 1971; Dundr, Olson, 1998). Однако применение чувствительных методов выявления активной рДНК *in situ* с помощью бромированного уридинтрифосфата позволяет заключить, что транскрипция рДНК продолжается в течение всей профазы и прекращается лишь с началом распада оболочки ядра в прометафазе (рис. 2). С помощью антител к различным белкам ядрышка, а также наблюдений за живыми клетками, в которых осуществляется экспрессия белков ядрышка, слитых с репортными флуоресцентными белками, показано, что эти процессы сопровождаются миграцией части белков ядрышка в нуклеоплазму и началом формирования периферического хромосомного материала (ПХМ; см. ниже). К белкам, теряющим связь с ядрышком в профазе митоза, относятся в первую очередь белки, принимающие участие в процессинге рРНК и сборке рибосомных частиц. Компоненты транскрипционного комплекса РНК-полимеразы I, такие как *bona fide* субъединицы РНК-полимеразы I — RPA194 и RPA135, ее специфический кофактор белок UBF, а также транскрипционный фактор TIF-IB/SL1, сохраняют прочную связь с ЯОР хромосом. В связи с ЯОР сохраняются также фактор терминации транскрипции TTF-1 и ДНК-топоизомераза I (Zatsepina et al., 1993, 1996; Roussel et al., 1996; Leung et al., 2004; Chen et al., 2005).

Известна работа, в которой поведение маркерных белков ядрышка прослежено в связи с состоянием ядерной оболочки, начало распада которой совпадает с переходом от профазы к прометафазе митоза (Leung et al., 2004). Применяв метод 4D-микроскопии, позволяющий регистрировать пространственные изменения в локализации белков с течением времени, авторы этой работы показали, что диссоциация субъединиц РНК-полимеразы I из ядрышка происходит до окончания распада ядерной оболочки. Напротив, отчетливая миграция белковых маркеров ПФК (фибрилларина) и ГК (B23 и RL27) в ядро и цитоплазму происходит одновременно с распадом ядерной оболочки. При этом фибрилларин, B23 и RL27 мигрируют из ядрышка практически одновременно, тогда как потеря RPA39 опережает эти процессы на 4—5 мин. Количественный анализ скорости миграции белков из ядрышка показал, что B23 и RL27 имеют большую скорость диссоциации, чем RPA39 или фибрилларин (Leung et al., 2004). В целом эти наблюдения подтверждают данные о различиях в подвижности разных белков ядрышка и ставят под сомнение традиционные представления о прочной связи всех компонентов транскрипционного комплекса РНК-полимеразы I с рДНК во время митоза. Однако другие работы, указывающие на возможность диссоциации комплекса РНК-полимеразы I—ЯОР в митозе, нам неизвестны, и справедливость представленных данных (Leung et al., 2004) нуждается в подтверждении на других экспериментальных моделях.

Судьба рРНК интерфазного ядрышка в первой половине митоза прослежена значительно менее подробно, чем судьба белков ядрышка, поскольку в настоящее время практически отсутствуют подходы для анализа дина-

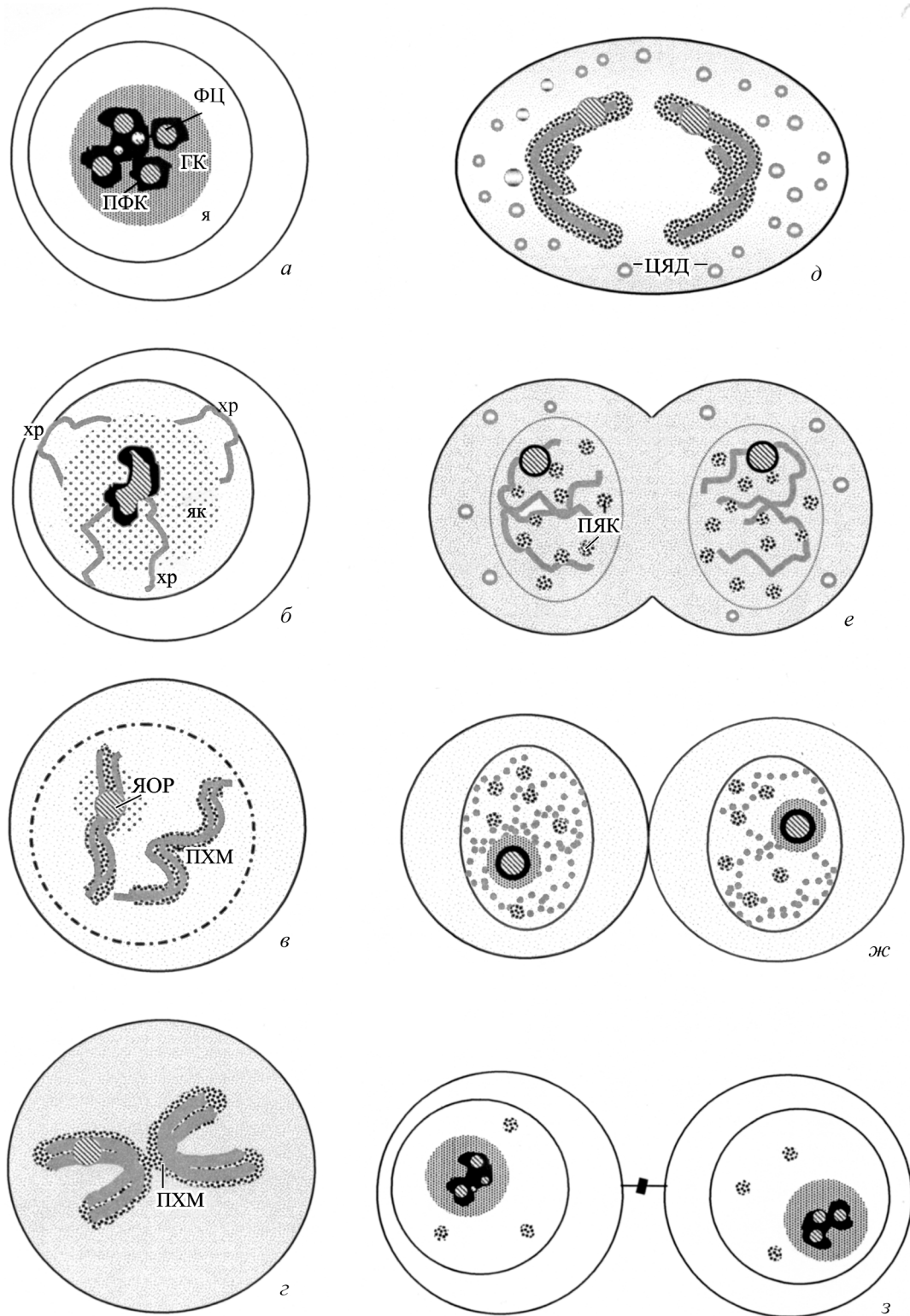


Рис. 2. Схема, иллюстрирующая динамику ядрышка в митозе.

a — интерфаза, *б* — профаза, *в* — прометафаза, *г* — метафаза, *д* — анафаза, *е* — ранняя телофаза, *ж* — средняя телофаза, *з* — поздняя телофаза. я — ядро, як — ядрышко, хр — хромосомы, ФЦ — фибриллярные центры, ПФК — плотный фибриллярный компонент, ГК — гранулярный компартмент, ЯОР — ядрышкообразующий район хромосомы, ПХМ — перихромосомный материал, ЦЯД — цитоплазматические ядрышковые дериваты, ПЯК — проядрышки (объяснения в тексте).

мики РНК в живых клетках. Методами флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с использованием зондов к рРНК различной степени зрелости показано, что 47S пре-рРНК, синтезированные в конце G₂-периода и в профазе, сохраняются вплоть до метафазы в виде рРНК с константой седиментации 46-45S, т. е. не подвергаются деградации или процессингу (Dundr, Olson, 1998; Dousset et al., 2000). По-видимому, незрелая рРНК входит в состав перихромосомного слоя и утилизируется для построения ядрышек в дочерних клетках в телофазе (Fan, Penman, 1971; Gautier et al., 1992a, 1992b, 1994; Ченцов, 2000; DiMario, 2004).

Судьба компонентов ядрышка в метафазе митоза

Наибольшее количество данных об изменениях ядрышка в митозе получено на клетках животных и растений, блокированных в метафазе с помощью цитостатиков. К ним в первую очередь относится нокодазол, который обладает сравнительно низкой токсичностью и легко отмывается от клеток, что позволяет синхронизировать клетки в постметафазных стадиях.

Не вызывает сомнения то, что в подавляющем большинстве клеток высших эукариот к метафазе митоза ядрышко полностью распадается и инактивируется (DiMario, 2004). Исключение, по-видимому, составляют лишь клетки китайского хомячка СНО, в которых ГК ядрышка сохраняет связь с ЯОР метафазных хромосом. Однако особенности организации ядрышек в клетках СНО не изучены в деталях, и их причины до сих пор остаются невыясненными. В большинстве клеток к метафазе митоза из морфологических субдоменов ядрышка удается идентифицировать только ЯОР хромосом, структура и иммуноцитохимические особенности которых практически не отличаются от таковых ФЦ (Goessens, 1984). Подобно ФЦ, ЯОР хромосом образованы тонкофибрилярным материалом низкой оптической плотности. Примечательно, что такая структура характерна только для ЯОР, транскрибируемых в интерфазе, предшествующей митозу, тогда как неактивные ЯОР на ультратонких срезах метафазных хромосом идентифицировать не удается. Этот факт говорит о том, что неактивные ЯОР не отличаются по своей морфологии от других участков метафазных хромосом (Зацепина и др., 1989а). Примечательным свойством активных ЯОР является их прочная связь с UBF и большими субъединицами РНК-полимеразы I — RPA194 и RPA135 (Leung et al., 2004). Поскольку эти белки относятся к аргентофильным белкам, их связь с ЯОР в метафазе обуславливает способность ЯОР окрашиваться AgNO₃ (Roussel, Hernandez-Verdun, 1994).

Важно, что малые субъединицы РНК-полимеразы I проявляют разную динамику в митозе. Субъединица RPA43, которая регулирует образование связи между иницирующим комплексом и другими субъединицами РНК-полимеразы I, остается ассоциированной с ЯОР в течение всего митоза. Напротив, RPA39, связывающаяся с транскрипционным комплексом на поздних этапах его формирования, не выявляется в связи с метафазными ЯОР. Кроме того, в метафазных ЯОР отсутствуют такие малые субъединицы РНК-полимеразы I, как RPA16 и RPA20 (Leung et al., 2004).

Наиболее значительные изменения локализации в метафазных клетках описаны для белков, принимающих участие в процессинге рРНК и сборке рибосом. Именно

за счет этих белков на поверхности хромосом происходит формирование особой структуры, которая в современной литературе получила название периферического хромосомного материала (ПХМ) или периферического хромосомного слоя (ПХС). ПХМ, ранее называвшийся «матриком» митотических хромосом, впервые описан в 1970-е годы при исследовании методом электронной микроскопии (Поляков, Ченцов, 1968; Ченцов, Поляков, 1969, 1974). Ультраструктурный анализ митотических хромосом в клетках растений и животных показал, что на их поверхности часто присутствует компонент, который состоит из рыхло расположенных фибрилл (диаметром 4—8 нм) и гранул (диаметром 15—20 нм), имеющих рибонуклеопротеидную природу. По морфологическим признакам этот материал соответствовал фибриллярному компоненту интерфазных ядрышек (Gautier et al., 1992b, 1992c; Бураков и др., 1994; Ченцов, 2000). На основании этих наблюдений авторы сделали вывод о том, что ПХМ содержит компоненты материнского ядрышка, которые транспортируются хромосомами в дочерние клетки. Позднее скопления белков и рРНК на поверхности хромосом были выявлены с помощью реакции серебрения, использования специфических антител к белкам ядрышка или меченых проб к нуклеиновым кислотам, а также путем анализа поведения белков в живых клетках (Stockert et al., 1970; Paweletz, Risueño, 1982; Hernandez-Verdun, Gautier, 1994; Лазарева и др., 1997а, 1997б; DiMario, 2004; Angelier et al., 2005; см. таблицу). В совокупности эти работы подтвердили, что на поверхности хромосом присутствуют белки, участвующие в процессинге рРНК, а также частично процессированная 45S рРНК, зрелые 18S и 28S рРНК, а также мкРНК. Кроме того, в состав ПХМ входят некоторые белки ядерного матрикса и неядрышковые белки, такие как перихромонуклеолин (perichromonucleolin, PCN), фосфорилированная форма нуклеоплазмина, белки ядерной оболочки и белок Ki-67, функции которого до сих пор остаются невыясненными (Brown, Gatter, 2002). В классических работах Ченцова установлено, что в клетках корневой меристемы растений образование ПХМ легко индуцируется в присутствии CoCl₂, хотя механизмы образования ПХМ под действием хлорида кобальта остаются неизвестными (Ченцов, Поляков, 1969).

В литературе описаны попытки изучения состава рРНК, ассоциированной с метафазными хромосомами, методами биохимического анализа (Fan, Penman, 1971; Abramova, Neyfakh, 1973). Авторы этих работ одними из первых указали на то, что фракция хромосом, изолированных из метафазных клеток, содержит 45S и 32S рРНК. Выход клеток из митотического блока сопровождался резким истощением пула 45S и 32S рРНК, что свидетельствовало о начале активного процессинга или деградации незрелой рРНК в постметафазе (Fan, Penman, 1971).

Вопрос о том, что направляет белки и рРНК распадающегося ядрышка на поверхность хромосом и удерживает их в составе ПХМ, остается открытым. Есть основания полагать, что взаимодействия, сохраняющие ядрышковые компоненты в ПХМ, отличаются от тех, которые удерживают те же компоненты в интерфазном ядрышке. Так, ПХМ оказывается устойчивым к обработке изолированных хромосом гипотоническими растворами в условиях разрушающих интерфазных ядрышки (Gautier et al., 1992c).

Примечательная универсальность состава ПХМ в разных объектах животного и растительного происхож-

Локализация основных молекулярных компонентов ядрышка в анафазе и телофазе

Компонент	ПХМ	ЦЯД	Прояд- рышки	Объект	Литературный источник
U3	+		+	HeLa, NRK-52E	Jiménez-García et al., 1994
	+	+	+	CHO	Azum-Gélade et al., 1994
	+	+	+	HeLa, HEp-2, PtK ₁ , CHO	Gautier et al., 1994
	+	+	+	<i>Pisum sativum</i> L.	Beven et al., 1996
	+	+	+	CMT3, 3T3, HeLa, COS-7	Dundr et al., 1997
U8	+	+	+	CMT3, HeLa	Dundr, Olson, 1998
U14	+	+	+	<i>Pisum sativum</i> L.	Beven et al., 1996
Фибрилларин (Nop1)	+		+	PtK ₂	Ochs et al., 1985b
	+	+	+	HeLa, HEp-2, PtK ₁ , CHO	Gautier et al., 1992a, 1994
	+		+	Mouse cells	Yasuda, Maul, 1990
	+		+	NRK-52E	Jiménez-García et al., 1989
	+	+	+	CHO	Azum-Gélade et al., 1994
	+		+	PtK ₂ , <i>Allium cepa</i> L.	Medina et al., 1995
	+		+	PtK ₂ , <i>Xenopus</i> A6	Weisenberger, Scheer, 1995
	+	+	+	<i>Pisum sativum</i> L.	Beven et al., 1996
	+	+	+	CMT3, 3T3, HeLa, COS-7	Dundr et al., 1996, 1997, 2000
	+		+	HeLa, PtK ₁	Fomproix et al., 1998
	+	+	+	HeLa, PK	Мухарьямова и др., 1998
	+		+	<i>Triticum aestivum</i> L.	Лазарева и др., 1997a
	B23 (ньюматрин, нуклеофозмин NO38)	+	+	+	HeLa
+		+	+	CV1, HeLa, 3T3, PK	Жарская, Зацепина, 2005a
+		+	+	PtK ₂	Ochs et al., 1983; Ochs, Busch, 1984; Ochs et al., 1985a
+		+	+	CMT3, 3T3, HeLa, COS-7	Dundr et al., 1996, 1997, 2000
+		+	+	CMT3, HeLa	Dundr, Olson, 1998
+		+	+	HeLa, PK	Zatsepina et al., 1997c
+			+	HeLa	Angelier et al., 2005
+		+	+	CV1, HeLa, 3T3, PK	Жарская, Зацепина, 2005a
+			+	HeLa, HEp-2, PtK ₁ , CHO	Gautier et al., 1994
Перихромонуклеолин нуклеолин (C23, Nsr1)		+		+	То же
	+	+	+	PtK ₂	Ochs et al., 1983; Ochs, Busch, 1984; Ochs et al., 1985a
	+		+	PtK ₂ , <i>Allium cepa</i> L.	Medina et al., 1995
	+		+	PtK ₂ , <i>Xenopus</i> A6	Weisenberger, Scheer, 1995
	+	+	+	CHO, HeLa	Zhu, DiMario, 1999
	+	+	+	CMT3, 3T3, HeLa, COS-7	Dundr et al., 1996, 1997, 2000
	+		+	HeLa	Piñol-Roma, 1999
	+		+	»	Angelier et al., 2005
	+	+	+	CV1, HeLa, 3T3, PK	Жарская, Зацепина, 2005a
	Ki-67	+		+	MOLT-4, MR65
+		+	+	NIH 3T3	Magoulas et al., 1998
Surf-6	+	+	+	CMT3, HeLa	Dundr, Olson, 1998
hPop	+	+	+	HeLa, HEp-2, PtK ₁ , CHO	Gautier et al., 1994
P52 (Nop52, Rrp1p)	+	+	+	CMT3, 3T3, HeLa, COS-7	Dundr et al., 1996, 1997
	+	+	+	CV1, HeLa, 3T3, PK	Жарская, Зацепина, 2005a
	+	+	+	HeLa	Savino et al., 2001
	+		+	»	Angelier et al., 2005

Продолжение таблицы

Компонент	ПХМ	ЦЯД	Прояд- рышки	Объект	Литературный источник
p66	+			HeLa, HEp-2, PtK1, CHO	Gautier et al., 1992a
p103	+			То же	То же
No55	+	+	+	CMT3, 3T3, HeLa, COS-7	Dundr et al., 1997
SSBI	+		+	<i>Pisum sativum</i> L.	Beven et al., 1996
Nopp140	–	–	–	CMT3, 3T3, HeLa, COS-7	Dundr et al., 1997
Pescadillo (PES1, YPH1, Nop7p, Pes1)	+	+	+	NIH 3T3	Lerch-Gaggl et al., 2002
Рибосомный белок S6	+		–	HeLa, NRK-52E	Jiménez-García et al., 1994
РНК-полимераза I	–	–	–	PtK ₂ , HeLa, NRK-52E	Scheer, Rose, 1984; Jiménez-García et al., 1989
UBF	–	–	–	HeLa	Roussel et al., 1996
				HeLa, PK	Zatsepina et al., 1993, 1996
pp135	–	–	–	HEp-2	Vandelaer, Thiry, 1998
Пре-рРНК	+		+	PtK ₂ , <i>Allium cepa</i> L.	Medina et al., 1995
32S пре-рРНК	+			HeLa	Piñol-Roma, 1999
	+		+ ^a	»	Dousset et al., 2000
5'ETS leader	–	–	–	CMT3, HeLa	Dundr, Olson, 1998
	–	–	–	CMT3	Dundr et al., 2000
5'ETS core	+	+		CMT3, HeLa	Dundr, Olson, 1998
	+			HeLa	Piñol-Roma, 1999
	+	+	–/+ ^a	CMT3	Dundr et al., 2000
	+		+ ^b	HeLa	Dousset et al., 2000
	+	+	+	<i>Pisum sativum</i> L.	Beven et al., 1996
18S	+	+		CMT3, HeLa	Dundr, Olson, 1998
	+			HeLa	Piñol-Roma, 1999
	+	+	–/+ ^a	CMT3	Dundr et al., 2000
ITS1	+	+		CMT3, HeLa	Dundr, Olson, 1998
	+	+	+	HeLa	Beven et al., 1996
28S	+	+		CMT3, HeLa	Dundr, Olson, 1998
	+			HeLa	Piñol-Roma, 1999
	+		+	»	Dousset et al., 2000
	+	+	+	CMT3	Dundr et al., 2000
3'ETS	+	+		CMT3, HeLa	Dundr, Olson, 1998

Примечание. ПХМ — перихромосомный материал, ЦЯД — цитоплазматические ядрышковые дериваты. ^a Сигналы гибридизации с пробями совпадают с локализацией C23 (нуклеолина). ^b Сигналы гибридизации с пробями не совпадают с локализацией B23.

дения говорит о том, что переносимые хромосомами белки и РНК не являются их случайными «пассажирами», а представляют собой компоненты, необходимые для быстрого восстановления синтеза рРНК в дочерних клетках (Earnshaw, Bernat, 1991; Hernandez-Verdun, Gautier, 1994; Medina et al., 1995; Ченцов, 2000). Неоднократно высказывались также предположения о том, что ПХМ необходим для поддержания структурной целостности хромосом, хотя результаты прямых экспериментов, подтверждающие эту точку зрения, пока отсутствуют. Разборка ПХМ в конце митоза совпадает с реактивацией синтеза рДНК, деконденсацией хроматина, формированием ядерной оболочки и появлением в ядрах дочерних клеток проядрышек (см. ниже) (см. обзоры: Hernandez-Verdun et al., 2002; Olson et al., 2002; DiMario, 2004; Hernandez-Verdun,

2004, 2006; Olson, Dundr, 2005). Эти наблюдения говорят о существовании функциональной связи между ПХС и другими компартментами митотической клетки.

Восстановление ядрышка в анафазе и телофазе митоза

Реактивация транскрипции рДНК. Необходимым условием восстановления функционирующего ядрышка в конце митоза является реактивация транскрипции рДНК, которая обычно начинается в поздней анафазе или ранней телофазе (Morcillo et al., 1976; Roussel et al., 1996; Frompoix et al., 1998; Мухарьямова, Зацепина, 2001; Hernandez-Verdun et al., 2002; Leung et al.,

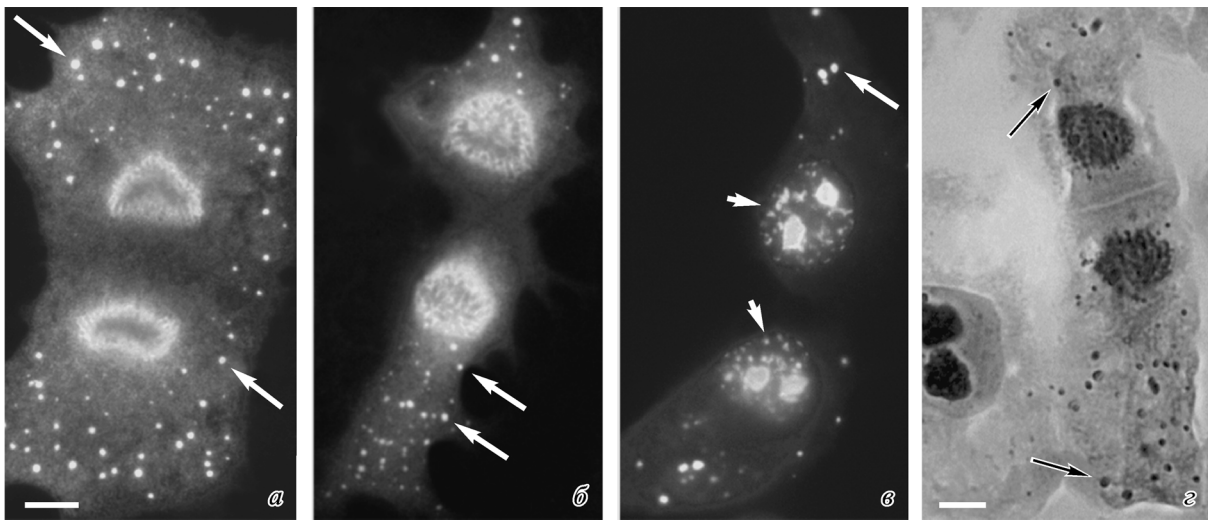


Рис. 3. Цитоплазматические ядрышковые дериваты и проядрышки в митотических клетках эукариот. Иммуноцитохимическое окрашивание клеток CV1 антителами к белку B23 (а—в) и выявление аргентофильных белков ядрышка нитратом серебра в клетках *Allium cepa* L. (д).

а — поздняя анафаза, б — ранняя телофаза, в — поздняя телофаза (ранний G₁-период), д — ранняя телофаза; стрелки — ЦЯД; головки стрелок — проядрышки. Масштабная линия — 10 мкм.

2004). В пользу этого вывода говорят многочисленные экспериментальные данные. Так, показано, что инъекция антител к РНК-полимеразе I в метафазные клетки PtK₂ препятствует реактивации синтеза рРНК и сборке ядрышка в телофазе, хотя в ядрах клеток собирались многочисленные тельца, обладающие свойствами проядрышек (Benavente et al., 1987). Аналогичные результаты были получены при инкубации митотических клеток с актиномицином Д, который в концентрации 0.04—0.20 мкг/мл избирательно блокирует транскрипцию рДНК (Ченцов, Андреев, 1966; Scheer et al., 1975; Ochs et al., 1985a; Benavente et al., 1987; Dousset et al., 2000). Несмотря на то что в присутствии актиномицина Д UBF и РНК-полимераза I остаются связанными с ЯОР (Zatsepina et al., 1993), а в телофазных ядрах формируются проядрышки, зрелые ядрышки в них не образуются (Ченцов, Андреев, 1966; Morcillo, De la Torre, 1980; Ochs et al., 1985a; Benavente et al., 1987; Dousset et al., 2000). При более подробном изучении действия актиномицина Д в низкой концентрации (0.04 мкг/мл) показано, что белки нуклеолин и фибрилларин способны накапливаться в UBF-позитивных ЯОР в телофазе (Hadjilov, 1985; Scheer, Benavente, 1990; Puvion-Dutilleul et al., 1992; Dousset et al., 2000). Однако в клетках, вступивших в G₁-период, зрелые, т. е. содержащие ФЦ, ПФК и ГК, ядрышки не выявлялись. Ингибитор топоизомеразы I камптотecin, блокируя реинициацию транскрипции рДНК в телофазе, также препятствовал формированию нормальных ядрышек в последующей интерфазе (Weisenberger et al., 1993). Совокупность этих наблюдений убедительно свидетельствует в пользу возможности инициации, но не завершения сборки ядрышка в отсутствие синтеза рРНК.

Существенным аргументом, подтверждающим решающую роль реактивации рДНК в формировании ядрышка в митозе, служат данные об индукции преждевременной транскрипции в метафазных клетках HeLa при ингибировании росковитином циклин В-зависимой киназы Cdk 1 (Sirri et al., 2000, 2002). Как известно, киназа Cdk 1 является основной киназой, фосфорилирующей транс-

крипционные факторы при вступлении клеток в митоз, что в свою очередь приводит к остановке транскрипции рДНК (Grummt, 1999; Klein, Grummt, 1999). Сирри с соавторами (Sirri et al., 2000) показали, что инкубация клеток с росковитином приводит к преждевременной активации транскрипции рДНК и синтезу 47S пре-рРНК в метафазе митоза. Этот процесс сопровождался миграцией фактора раннего процессинга пре-рРНК белка фибрилларина в активированные ЯОР хромосом, хотя процесс формирования активного ядрышка не завершился. Об этом, в частности, свидетельствовало отсутствие процессинга незрелой 47S-45S пре-рРНК в зрелые 18S, 5.8S и 28S рРНК. Приведенные данные говорят о том, что в метафазе митоза клетки лишены механизма (или механизмов), запускающего полный процесс восстановления ядрышка.

Цитоплазматические производные ядрышка. Следующий признак начала реформирования ядрышка после реактивации транскрипции рДНК — появление в цитоплазме анафазных (ранних телофазных) клеток многочисленных дискретных телец (диаметром 0.2—2.0 мкм), которые получили название цитоплазматических ядрышковых дериватов (ЦЯД) — nucleolus derived foci, NDF (рис. 3). Впервые тельца были описаны в митотических клетках мартышки СМТ3, стабильно трансфицированных плазмидой, экспрессирующей белок Rev вируса СПИДа (Dundr et al., 1996). Присутствие в ЦЯД также таких белков зрелого ядрышка, как фибрилларин, B23, C23 и Nop52, позволило авторам предположить, что ЦЯД соответствуют цитоплазматическим «остаткам ядрышка» (nucleolar remnants, NPs), которые ранее были описаны другими авторами (Hsu et al., 1965; Noel et al., 1971; Azum-Gelade et al., 1994; Gautier et al., 1994; Zatsepina et al., 1997c). Во всех этих работах отмечалось, что образование ЦЯД характерно для активно пролиферирующих клеток (например, китайского хомячка СНО или свиньи СПЭВ), а также клеток, которые обладают крупными ядрышками в интерфазе. Следует помнить, что некоторые авторы называли термином «nucleolar remnants» ядрышковый материал, оставшийся после

разборки ядрышка в профазе и выявляемый в начале метафазы (Morcillo et al., 1976; Medina et al., 1995). Однако в современной литературе этот термин не употребляется. По-видимому, наибольшее число ЦЯД формируется в телофазе в культивируемых клетках зеленой мартышки. Так, в телофазных клетках мартышки линий СМТЗ и CV1 образуется более 100 ЦЯД (Жарская, Зацепина, 2005a; Olson, Dundr, 2005). У растений аналогами ЦЯД принято считать цитоплазматические тельца, которые содержат аргентофильные белки. Такие тельца были впервые описаны в цитоплазме анафазных и телофазных клеток корневой меристемы лука *Allium cepa* L. (Fernandez-Gomez et al., 1983). Аналогичные тельца, содержащие фибрилларин, частично процессированную пре-рРНК, U3 и U14 мякРНК, были описаны также в анафазных клетках корневой меристемы гороха *Pisum sativum* L. (Beven et al., 1996). Таким образом, ЦЯД — это универсальные структуры, образующиеся в клетках животных и растений практически одновременно с возобновлением транскрипции рДНК.

Наши наблюдения показали, что во всех исследованных клетках млекопитающих — HeLa человека, CV1 мартышки, 3ТЗ мыши и СПЭВ свиньи — ЦЯД формируются практически одновременно с началом сегрегации хромосом, т. е. в ранней или средней анафазе (Жарская, Зацепина, 2005a). Однако «эффективность» образования этих телец варьировала в разных типах клеточных культур, что, по-видимому, связано с особенностями их метаболизма. Кроме того, нами показана сборка многочисленных дискретных телец в метафазных клетках млекопитающих под действием обратимого гипотонического шока. Общая морфология и молекулярный состав таких телец позволяют отождествлять их с ЦЯД, формирующимися в анафазе нормального митоза (Жарская, Зацепина, 2005b).

Состав ЦЯД. Основными молекулярными компонентами ЦЯД в клетках животных являются РНК и белки зрелого ядрышка, а также рибонуклеопротеины, имеющие ядерное происхождение (см. таблицу). Показано, что в состав ЦЯД входят белки раннего и позднего процессинга рРНК: фибрилларин, С23 (нуклеолин), В23 (нуклеофозмин) и Нор52 (p52) (Beven et al., 1996; Dundr et al., 1996, 1997, 2000; Zatschina et al., 1997c; Мухарьямова и др., 1998; Dundr, Olson, 1988; Жарская, Зацепина, 2005), U3 и U8 мякРНК (Beven et al., 1996; Dundr et al., 1997; Dundr, Olson, 1998), а также рРНК. В работах Дундра и Олсона с помощью метода флуоресцентной РНК—РНК-гибридизации *in situ* (FISH) и Нозерн-блот-анализа показано, что в ЦЯД присутствует частично процессированная пре-рРНК (Dundr, Olson, 1998). Специфические меченные биотином пробы РНК к коревой части 5'-внешнего транскрибируемого спейсера пре-рРНК (5'ETS core part), последовательностям 18S рРНК, первого внутреннего транскрибируемого спейсера пре-рРНК (ITS1), концу 28S рРНК и 3'-внешнему транскрибируемому спейсеру пре-рРНК (3'ETS) метили ЦЯД в анафазных клетках СМТЗ. Ни одна из рибопроб не окрашивала ЯОР хромосом вплоть до начала реактивации транскрипции рДНК в телофазе, демонстрируя тем самым, что первичные транскрипты рРНК отщепляются от матрицы «молчащей» рДНК в начале митоза. рРНК, входящая в состав ЦЯД, связана с белками, поскольку обработка клеток РНКазой А предотвращает мечение ЦЯД антителами к белкам В23 и фибрилларину (Жарская, Зацепина, 2005a).

Есть основания полагать, что рРНК, входящая в состав ЦЯД, является необходимой для их формирования и синтезируется за несколько часов до начала деления клеток. Об этом свидетельствует частичное через 2—3 ч и полное через 4—6 ингибирование формирования ЦЯД после добавления к культуральной среде ингибиторов синтеза рРНК и процессинга пре-рРНК — актиномицина Д и ДРВ соответственно (Жарская, Зацепина, 2005a).

Проядрышки (prenucleolar bodies, PNBs). Лафонтен (Lafontaine, 1958) представил подробный доклад о ранних исследованиях пренуклеолярного материала (проядрышек) в митозе. Согласно Лафонтену, пренуклеолярные тельца в телофазных клетках были впервые описаны исследователем Ван Кампом (Van Camp) в 1924 г. Позднее ультраструктурные исследования пренуклеолярных телец выполнены на *Allium cepa* L. (лук) и *Vicia faba* L. (бобы) (Lafontaine, 1958; Lafontaine, Chouinard, 1963). Стивенс (Stevens, 1965) обнаружил эти структуры в нейробластах эмбрионов *Chortophaga viridifasciata* (саранча) и одним из первых попытался показать преемственность между проядрышками и ПХМ. Согласно его данным, проядрышки представляют собой многочисленные округлые дискретные тельца, которые появляются в ядрах телофазных клеток одновременно с деконденсацией хромосом и формированием ядерной оболочки. Их формирование начинается с появления на поверхности анафазных хромосом сначала мелких (0.2—0.3 мкм в диаметре), а потом крупных (0.3—0.7 мкм в диаметре) телец, которые по морфологии соответствовали «свободным» проядрышкам в ядрах телофазных клеток (рис. 3). Разными авторами показано, что проядрышки состоят из плотно упакованных гранул и фибрилл РНП, которые по своим размерам соответствуют гранулам и фибриллам интерфазного ядрышка и ПХМ (Stevens, 1965; Ченцов, Поляков, 1969, 1974; Morcillo, De la Torre, 1980).

В таблице приведены основные молекулярные компоненты, выявленные в проядрышках современными методами клеточной и молекулярной биологии. Видно, в частности, что универсальными компонентами проядрышек в клетках млекопитающих (Azum-Gélade et al., 1994; Jiménez-García et al., 1994) и растений (Beven et al., 1996) являются U3, U8 и U14 мякРНК, частично процессированная пре-рРНК и белки зрелого ядрышка, участвующие в процессинге рРНК, — фибрилларин, В23, С23 и Нор52. Для того чтобы установить роль каждого из компонентов проядрышек в их формировании, в экспериментах добавляли лишние мембраны ядра спермиев *Xenopus laevis* к активным цитоплазматическим яйцевым экстрактам ооцитов шпорцевой лягушки (Bell et al., 1997). Полученные наблюдения показали, что существенную роль в формировании проядрышек *in vitro*, по-видимому, играет фибрилларин, поскольку истощение экстрактов антителами именно к этому белку уменьшало число сформировавшихся проядрышек. Показано, что обратимое воздействие растворов низкой ионной силы приводит к образованию в ядрах интерфазных клеток телец, обладающих свойствами проядрышек (Zatschina et al., 1997a, 1997b; Zhu et al., 1999).

Во многих работах высказывалось предположение о том, что материал ПХМ перемещается с поверхности хромосом в проядрышки, которые затем сливаются друг с другом и собираются в области активированного ЯОР в телофазе (Lafontaine, 1958; Lafontaine, Chouinard, 1963; Stevens, 1965; Ченцов, Поляков, 1969, 1974; Morcillo et al., 1976; Ochs et al., 1985a; Medina et al., 1995). В послед-

ние годы эксперименты с маркированными белками в живых клетках прямо подтвердили это предположение. Так, были получены клетки HeLa, стабильно трансфицированные плазмидами, экспрессирующими фибрилларин и Nop52, маркированные разными флуоресцентными белками (Savino et al., 1999, 2001). В таких клетках оба белка колокализовались в ПХМ в метафазе и анафазе. Однако как только хромосомы достигали полюсов деления, фибрилларин отделялся от периферии хромосом, а в телофазе мигрировал в проядрышки и активированные ЯОР. По сравнению с фибрилларин Nop52 более медленно диссоциировал из ПХМ и мигрировал в «поздние проядрышки», которые отличались от «ранних проядрышек» отсутствием фибрилларина. В отличие от фибрилларина Nop52 мигрировал в ядрышки лишь в раннем периоде G₁. Содержащие фибрилларин проядрышки существовали в течение 15 ± 5 мин, в то время как Nop52-содержащие проядрышки были более стабильными и сохранялись в ядрах 80 ± 20 мин. Авторы также описали появление фибрилларин-положительных «мостиков», связывающих некоторые проядрышки друг с другом и с формирующимися ядрышками. Появление «мостиков» сопровождалось уменьшением флуоресцентного сигнала в одном «связанном» проядрышке с одновременным усилением сигнала в другом. Эти наблюдения свидетельствуют в пользу однонаправленного перемещения (перетекания) ядрышкового материала из одного проядрышка в другое.

Другая группа исследователей изучила поведение мутантных белков B23—GFP, фибрилларина — GFP и C23—GFP в стабильно трансфицированных клетках СМТ3 (Dundr et al., 2000). Показано, что проядрышки возникают в ранней телофазе и перемещаются по ядру со скоростью 2.4 мкм/мин. Некоторые проядрышки сливаются друг с другом, формируя проядрышки большего размера, другие образуют контакты с ядрышком посредством «мостиков», аналогичных описанным в работе Савино с соавторами (Savino et al., 2001). С помощью 4D-микроскопии, позволяющей регистрировать изменения интенсивности флуоресценции во времени и пространстве, показано, что одновременно с усилением сигналов в формирующихся ядрышках число, размер и интенсивность флуоресценции проядрышек падают.

Последние данные, касающиеся динамики проядрышек, были получены с использованием методов коэкспрессии генов химерных белков фибрилларин—GFP/B23—DsRed, Nop52—GFP/B23—DsRed, B23—GFP/Nop52—DsRed, Bop1—GFP/B23—DsRed и B23—DsRed/Nop52—GFP в клетках HeLa (Angelier et al., 2005). Авторы этой работы применили высокоразрешающий флуоресцентный метод, позволяющий анализировать взаимодействие белков *in vivo* на расстоянии порядка 6 нм, основанный на принципе Фёрстеровского резонансного переноса энергии (FRET; Emiliani et al., 2003). В результате были выявлены взаимодействия между белками позднего процессинга Nop52 и B23 в ядрышке и некоторых проядрышках, но не в ПХМ. Между фибрилларин и B23 таких взаимодействий не наблюдалось. Полученные данные позволили предположить, что проядрышки являются пунктами для предварительной сборки комплексов, участвующих в процессинге рРНК (pre-assembly platforms). Кроме того, показано, что в начале телофазы, когда происходит формирование проядрышек, индивидуальные проядрышки содержат компоненты раннего (фибрилларин) и позднего (B23) процессинга рРНК при-

близительно в течение 10 мин. Позднее фибрилларин исчезает из проядрышек, в которых, однако, сохраняется белок B23. На основании полученных результатов авторы предположили, что порядок миграции ядрышковых белков из проядрышек в нуклеоплазму, а затем в формирующиеся ядрышки отражает этап (ранний или поздний) их участия в процессинге рРНК (Olson, Dundr, 2005; Hernandez-Verdun, 2006). В целом эти данные согласуются с тем, что ПФК формируется в процессе нуклеогенеза раньше ГК. Количественный анализ показал, что ГК образуется приблизительно через 18 мин после ПФК и через 27 мин после завершения сборки полноценного комплекса РНК-полимеразы I, свидетельствующего о начале транскрипции рДНК в дочерних ядрах (Leung et al., 2004). Кинетика формирования ГК в целом соответствует времени, необходимому для созревания малой субъединицы рибосомы (около 20 мин). В клетках в течение первых 20 мин после митоза происходит увеличение кластеров ПФК приблизительно до 7 на ядро (за точку отсчета принято время разделения хромосом в анафазе). Однако после окончания формирования ГК общее число кластеров ПФК уменьшалось в среднем до 4.5 благодаря слиянию соседних кластеров. Таким образом, формирование ГК сопровождается слиянием ПФК.

Динамика ЦЯД и проядрышек. Впервые динамика ЦЯД и проядрышек в живых клетках была прослежена Дундром с соавторами (Dundr et al., 2000) с использованием цейтраферной видеомикроскопии и трансфекции клеток плазмидами, кодирующими химерные белки B23—GFP, фибрилларин—GFP и C23—GFP. Авторы описали беспорядочные перемещения ЦЯД в цитоплазме со скоростью 1.8—15.0 мкм/мин в телофазных клетках СМТ3, а в редких случаях — их слияние (Dundr et al., 2000). Поскольку число ЦЯД в клетках с течением телофазы уменьшалось, а интенсивность флуоресценции маркерных белков с внутренней стороны ядерной оболочки при этом возрастала, был сделан вывод о том, что материал ЦЯД может мигрировать внутрь ядра. На основании этих наблюдений была предложена следующая схема поведения ЦЯД в митозе: при разборке ЦЯД их компоненты входят в ядро, затем мигрируют в проядрышки, которые в свою очередь переносят материал ЦЯД в зону формирующихся ядрышек.

Согласно данным литературы, ЦЯД способны перемещаться по цитоплазме со скоростью 1.8—15.0 мкм/мин. Однако к настоящему времени не предложено никаких гипотез относительно механизмов движения ЦЯД в клетках. Наши наблюдения о колокализации ЦЯД с астральными микротрубочками веретена деления указывают на то, что в перемещениях ЦЯД в телофазе могут принимать участие элементы цитоскелета (Жарская, Зацепина, 2005а). Результатом этих перемещений может быть слияние ЦЯД друг с другом и(или) с ядром (Dundr et al., 2000). В пользу этого предположения свидетельствует сходство молекулярного состава и ультраструктурной организации ЦЯД и проядрышек. ЦЯД и проядрышки содержат одни и те же ядрышковые компоненты (белки, мРНК и пре-рРНК; см. таблицу) и образованы фибриллярно-гранулярным материалом (Dundr et al., 1997, 2000; Dundr, Olson, 1998). Однако между цитоплазматическими и ядерными производными ядрышка существуют некоторые различия. Во-первых, ЦЯД более лабильны, чем проядрышки, и могут совершать свободные движения на большие расстояния. Во-вторых, проядрышки — более мелкие и однородные по размерам обра-

зования (диаметром 0.2—0.7 мкм), в то время как размеры ЦЯД варьируют в диаметре от 0.2 до 1.0—2.0 мкм. В-третьих, проядрышки отличаются от ЦЯД по содержанию рРНК. Так, в отличие от ЦЯД проядрышки содержат 28S рРНК, но лишены 47-45S пре-рРНК и 18S рРНК. В-четвертых, время существования фибрилларина маркерного белка раннего процессинга рРНК в ЦЯД оказывается более продолжительным, чем в проядрышках. Это приводит к тому, что в клетках раннего G₁-периода, содержащих ЦЯД, белковый состав проядрышек и ЦЯД различается (Dundr et al., 2000; Olson, Dundr, 2005).

Механизмы реорганизации ядрышка в митозе

Несмотря на большое количество экспериментальных данных о динамике ядрышка и его основных белков в митозе, они не дают сегодня возможности полностью раскрыть проблему реорганизации ядрышка в митозе. Обобщая наблюдения, цитированные выше, можно предположить следующую модель реорганизации ядрышка при делении клеток высших эукариот. Транскрипция рДНК постепенно прекращается в профазе, полностью завершаясь к концу прометафазы. Транскрипты пре-рРНК, которые были синтезированы в начале митоза и (или) в предыдущей интерфазе, но не успели завершить процесс созревания, при разрушении ядрышка мигрируют в нуклеоплазму. При этом частично процессированные пре-рРНК сохраняют связь с некоторыми компонентами ядрышка (в первую очередь с белками и мРНК, участвующими в процессинге рРНК) и формируют ПХМ в метафазе. В анафазе некоторое количество этого материала остается в ПХМ, в то время как другая часть формирует ЦЯД. Когда в телофазе хромосомы начинают деконденсироваться, а вокруг них формируется ядерная оболочка, материал перемещается от ЦЯД в нуклеоплазму, где их материал включается в состав проядрышек. Проядрышки формируются также из материала, который был ассоциирован с поверхностью хромосом. Активация транскрипции рДНК инициирует перемещение ядрышкового материала от проядрышек к ЯОР. Различающийся во времени порядок миграции компонентов раннего (фибрилларин) и позднего (B23 и Нор52) процессинга рРНК отражает очередность стадий созревания прерибосом, в которых участвуют эти белки (Мухарьямова и др., 1998). Возврат компонентов процессинга рРНК в формирующиеся ядрышки осуществляется скорее путем диффузии, чем за счет активного транспорта. Таким образом, согласно этой модели, основная функция ЦЯД — это участие в сборке проядрышек, а проядрышек — в сборке ядрышек (Dundr et al., 2000; DiMario, 2004; Olson, Dundr, 2005). Особо подчеркивалось, что проядрышки способны сливаться с ЯОР и формировать полноценные ядрышки только в присутствии активных рибосомных генов (Dusset et al., 2000).

Пусковым механизмом, запускающим распад ядрышка при вступлении клеток в митоз, является дополнительное фосфорилирование его основных белков. К таким белкам относятся компоненты транскрипционного комплекса РНК-полимеразы I: TIF-IB/SL1 (Grummt, 1999), UBF (Klein, Grummt, 1999) и TTF-1 (Sirri et al., 1999), а также белки, участвующие в процессинге рРНК, — B23 (нуклеофозмин) и C23 (нуклеолин) (Belenger et al., 1990; Peter et al., 1990; Jiang et al., 2000; Tokuyama et al., 2001; Okuwaki et al., 2002). Фосфорилиро-

вание этих белков осуществляется основной митотической киназой Cdk1 (p34^{cdc2}), активность которой проявляется в комплексе с циклином В (Епифанова, 2003). Показано, что митотическое гиперфосфорилирование Cdk 1 ингибирует рРНК-связывающую активность B23, что повышает растворимость белка, способствует его миграции из ядрышка в нуклеоплазму, а после распада ядерной оболочки — в цитоплазму (Okuwaki et al., 2002).

Молекулярные механизмы сборки ядрышка в конце митоза в настоящий момент изучены недостаточно. Показано, что возобновление транскрипции рДНК сопровождается частичным дефосфорилированием UBF (Voit et al., 1999). Однако эти наблюдения противоречат данным Сирри с соавторами, согласно которым преждевременная активация рДНК росковитином не сопровождается изменением уровня фосфорилирования UBF (Sirri et al., 2000). Принято считать, что по мере завершения митоза происходят процессы, обратные тем, которые имеют место при вступлении клеток в митоз. К ним относятся деградация циклина В, которая осуществляется с участием убиквитинзависимых протеолитических ферментов белкового комплекса APC/C (anaphase-promoting complex/cyclosome ubiquitin ligase), стимулирующего анафазу. Эти реакции приводят к инактивации комплекса Cdk 1—циклин В (Clute, Pines, 1999) и вызывают дефосфорилирование компонентов транскрипционного комплекса РНК-полимеразы I (UBF, TIF-IB/SL1), а также белков B23 (нуклеофозмина) и C23 (нуклеолина), которые участвуют в процессинге рРНК. Снижение уровня фосфорилирования этих белков приводит к повышению их рРНК-связывающей активности и стимулирует начало сборки рибосомных частиц. Плейотропность эффектов ингибирования Cdk 1 при клеточном делении подтверждается также недавними наблюдениями об индукции преждевременной цитотомии без расхождения хромосом к полюсам веретена в присутствии специфического ингибитора Cdk 1 BMI-1026 (Niya et al., 2005).

Участие других известных регуляторов выхода клеток из митоза, включая polo-подобную киназу 1 (Plk 1; Zang et al., 2004; Liu, Maller, 2005), в восстановлении ядрышка может являться предметом будущих исследований. Эти исследования могут быть также посвящены выяснению механизмов направленного транспорта предшественников ядрышка в зону активированных ЯОР, разработке методики выделения предшественников из метафазных клеток и их последующему биохимическому анализу.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-49392) и программы РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Список литературы

- Бураков В. В., Чабан И. А., Поляков В. Ю., Ченцов Ю. С. 1994. Экстрахромосомный периферический материал в эндосперме пшеницы. Цитология. 36 (11): 1062—1068.
- Епифанова О. И. 2003. Лекции о клеточном цикле. М.: КМК. 159 с.
- Жарская О. О., Зацепина О. В. 2005а. Закономерности образования цитоплазматических производных ядрышка в разных культурах клеток млекопитающих в митозе. Цитология. 47 (9): 780—788.

- Жарская О. О., Зацепина О. В. 2005б. Закономерности образования цитоплазматических производных ядрышка в разных культурах клеток млекопитающих в митозе. Цитология. 47 (10) : 874—881.
- Зацепина О. В., Северова Е. Л., Дыбан А. П., Ченцов Ю. С. 1989а. Ультраструктура и арентофильные свойства ядрышкообразующих и центромерных районов хромосом в раннем эмбриогенезе мыши. Цитология. 29 (6) : 626—632.
- Зацепина О. В., Челидзе П. В., Ченцов Ю. С. 1989б. Изменение числа и размеров фибриллярных центров при инактивации ядрышек в процессе эритропореза. Онтогенез. 20 (1) : 40—46.
- Лазарева Е. М., Зацепина О. В., Поляков В. Ю., Шамбарант О. Г., Стукачева Е. А., Ченцов Ю. С. 1997а. Компартиментализация некоторых ядерных белков в интерфазе и митозе II. Иммуноцитохимическое изучение локализации белков ядрышка с мол. массами 53 и 34 кДа в интерфазных и митотических клетках эндосперма пшеницы *Triticum aestivum*. Цитология. 39 (9) : 842—847.
- Лазарева Е. М., Поляков В. Ю., Зацепина О. В., Шамбарант О. Г., Стукачева Е. А., Ченцов Ю. С. 1997б. Компартиментализация некоторых ядерных белков в интерфазе и митозе. I. Локализация арентофильных белков ядра в интерфазных и митотических клетках эндосперма пшеницы. Цитология. 39 (8) : 688—693.
- Мухарьямова К. Ш., Дудник О. А., Сперанский А. И., Зацепина О. В. 1998. Сравнительная локализация основных белков ядрышка фибрилларина и B23 в делящихся клетках млекопитающих. Биол. мембраны. 15 (6) : 657—669.
- Мухарьямова К. Ш., Зацепина О. В. 2001. Визуализация транскрипции рибосомных генов в клетках культуры ткани СПЭВ с помощью бромированного уридинтрифосфата. Цитология. 43 (8) : 792—796.
- Поляков В. Ю., Ченцов Ю. С. 1968. Электронно-микроскопическое выявление матрикса хромосом в связи с их естественным разрыхлением. ДАН СССР. 182 (2) : 205—208.
- Челидзе П. В., Зацепина О. В. 1989. Морфофункциональная классификация ядрышек. Успехи соврем. биол. 105 (2) : 252—268.
- Ченцов Ю. С. 2000. Периферический материал или матрикс митотических хромосом: структура и функции. Онтогенез. 31 (6) : 388—399.
- Ченцов Ю. С., Андреев В. В. 1966. Подавление роста ядрышек в разделившихся клетках культуры ткани при действии низких доз актиномицина. Прижизненные наблюдения. Журн. общ. биол. 27 (5) : 615—619.
- Ченцов Ю. С., Поляков В. Ю. 1969. Электронно-микроскопическое исследование хромосом *Crepis capillaris*. ДАН СССР. 189 (1) : 185—187.
- Ченцов Ю. С., Поляков В. Ю. 1974. Ультраструктура клеточного ядра. М.: Наука. 507 с.
- Abramova N. B., Neyfakh A. A. 1973. Migration of newly synthesized RNA during mitosis. III. Nuclear RNA in the cytoplasm of metaphase cells. Exp. Cell Res. 77 : 136—142.
- Andersen J. S., Lam Y. W., Leung A. K., Ong S. E., Lyon C. E., Lamond A. I., Mann M. 2005. Nucleolar proteome dynamics. Nature. 433 : 77—83.
- Andersen J. S., Lyon C. E., Fox A. H., Leung A. K. L., Lam Y. W., Steen H., Mann M., Lamond A. I. 2002. Directed proteomic analysis of the human nucleolus. Curr. Biol. 12 : 1—11.
- Angelier N., Tramier M., Louvet E., Coppey-Moisan M., Savino T. M., De Mey J. R., Hernandez-Verdun D. D. 2005. Tracking the interactions of rRNA processing proteins during nucleolar assembly in living cells. Mol. Biol. Cell. 16 : 2862—2871.
- Azum-Gélade M. C., Noaillac-Depeyre J., Caizergues-Ferrer M., Gas N. 1994. Cell cycle redistribution of U3 snRNA and fibrillarin. Presence in the cytoplasmic nucleolus remnant and in the pre-nucleolar bodies at telophase. J. Cell Sci. 107 : 463—475.
- Belenguer P., Caizergues-Ferrer M., Labbe J.-C., Doree M., Amalric F. 1990. Mitosis-specific phosphorylation of nucleolin by p34cdc2 protein kinase. Mol. Cell. Biol. 10 : 3607—3618.
- 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.
- Benavente R., Rose K. M., Reimer G., Hügle-Dörr B., Scheer U. 1987. Inhibition of nucleolar reformation after microinjection of antibodies to RNA polymerase I into mitotic cells. J. Cell Biol. 105 : 1483—1491.
- Beven A. F., Lee R., Razaz M., Leader D. J., Brown J. W., Shaw P. J. 1996. The organization of ribosomal RNA processing correlates with the distribution of nucleolar snRNAs. J. Cell Sci. 109 : 1241—1251.
- Brown D. C., Gatter K. C. 2002. Ki67 protein: the immaculate deception? Histopathology. 40 : 2—11.
- Chen D., Dundr M., Wang C., Leung A., Misteli T., Huang S. 2005. Condensed mitotic chromatin is accessible to the transcription machinery and chromatin structural proteins. J. Cell Biol. 168 : 41—54.
- Cheutin T., Misteli T., Dundr M. 2004. Dynamics of nucleolar components. In: The nucleolus. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 29—40.
- 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.
- Clute P., Pines J. 1999. Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase. Nat. Cell Biol. 1 (2) : 82—87.
- Cmarko D., Verschure P. V., Rothblum L. I., Hernandez-Verdun D., Amalric F., van Driel R., Fakan S. 2000. Ultrastructural analysis of nucleolar transcription in cell microinjected with 5-bromo-UTP. Histochem. Cell. Biol. 113 : 181—187.
- DiMario P. J. 2004. Cell and molecular biology of nucleolar assembly and disassembly. Int. Rev. Cytol. 239 : 99—178.
- Doussset T., Wang C., Verheggen C., Chen D., Hernandez-Verdun D., Huang S. 2000. Initiation of nucleolar assembly is independent of RNA polymerase I transcription. Mol. Biol. Cell. 11 : 2705—2717.
- Dundr M., Leno G. H., Lewis N., Rekosh D., Hammar-skjold M. L., Olson M. O. J. 1996. Location of the HIV-1 Rev protein during mitosis: inactivation of the nuclear export signal alters the pathway for postmitotic reentry into nucleoli. J. Cell Sci. 109 : 2239—2251.
- Dundr M., Meier U. T., Lewis N., Rekosh D., Hammar-skjold M. L., Olson M. O. J. 1997. A class of nonribosomal nucleolar components is located in chromosome periphery and in nucleolus-derived foci during anaphase and telophase. Chromosoma. 105 : 407—417.
- Dundr M., Misteli T., Olson M. O. J. 2000. The dynamic of postmitotic reassembly of the nucleolus. J. Cell Biol. 150 : 433—446.
- Dundr M., Olson M. O. J. 1998. Partially processed pre-rRNA is preserved in association with processing components in nucleolus-derived foci during mitosis. Mol. Biol. Cell. 9 : 2407—2422.
- Earnshaw W. C., Bernat R. L. 1991. Chromosomal passengers: toward an integrated view of mitosis. Chromosoma. 100 : 139—146.
- Emiliani V., Sanvitto D., Tramier M., Piolot T., Petrasek Z., Kemnitz K., Durieux C., Coppey-Moisan M. 2003. Low-intensity twodimensional imaging of fluorescence lifetimes in living cells. Appl. Phys. Lett. 83 : 2471—2473.
- Fan H., Penman S. 1971. Regulation of synthesis and processing of nucleolar components in metaphase-arrested cells. J. Mol. Biol. 59 : 27—42.
- Fatica A., Tollervey D. 2002. Making ribosomes. Curr. Opin. Cell. Biol. 14 : 313—318.
- Fernandez-Gomez M. E., Sanchez-Pina M. A., Risueno M. C., Medina F. J., Stockert J. C. 1983. Differential staining of the nucleolar organizing region (NOR) and nucleolar components by a new silver technique in plants. Cell Mol. Biol. 29 : 181—187.
- Fomproix N., Gebrane-Younes J., Hernandez-Verdun D. 1998. Effects of anti-fibrillarin antibodies on building of functional nucleoli at the end of mitosis. J. Cell Sci. 111 : 359—372.

- Fromont-Racine M., Senger B., Saveanu C., Fasiolo F. 2003. Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene*. 313 : 17—42.
- Gautier T., Dauphin-Villemant C., Andre C., Masson C., Arnoult J., Hernandez-Verdun D. 1992a. Identification and characterization of a new set of nucleolar ribonucleoproteins which line the chromosomes during mitosis. *Exp. Cell Res.* 200 : 5—15.
- Gautier T., Fomproix N., Masson C., Azum-Gelade M. C., Gas N., Hernandez-Verdun D. 1994. Fate of specific nucleolar perichromosomal proteins during mitosis: cellular distribution and association with U3 snoRNA. *Biol. Cell*. 82 : 81—93.
- Gautier T., Masson C., Quintana C., Arnoult J., Hernandez-Verdun D. 1992b. The ultrastructure of the chromosome periphery in human cell lines. An *in situ* study using cryomethods in electron microscopy. *Chromosoma*. 101 : 502—510.
- Gautier T., Robert-Nicoud M., Guilly M.-N., Hernandez-Verdun D. 1992c. Relocation of nucleolar proteins around chromosomes at mitosis. A study by confocal laser scanning microscopy. *J. Cell Sci.* 102 : 729—737.
- Goessens G. 1984. Nucleolar structure. *Int. Rev. Cytol.* 87 : 107—158.
- Grandi P., Rybin V., Bassler J., Petfalski E., Strauss D., Marzioch M., Schafer T., Kuster B., Tschochner H., Tollervey D., Gavin A. C., Hurt E. 2002. 90S preribosomes include the 35S-pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S-subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. *Mol. Cell*. 10 : 105—115.
- Granick D. 1975a. Nucleolar necklaces in chick embryo fibroblast cells. I. Formation of necklaces by dichlororibenzimidazole and other adenosine analogues that decrease RNA. *J. Cell Biol.* 153 : 1097—1110.
- Granick D. 1975b. Nucleolar necklaces in chick embryo fibroblast cells. II. Microscope observations of the effect of adenosine analogues on nucleolar necklace formation. *J. Cell Biol.* 65 : 418—427.
- Grummt I. 1999. Regulation of mammalian ribosomal gene transcription by RNA polymerase I. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 62 : 109—154.
- 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.
- Hadjiolov A. A. 1985. The nucleolus and ribosome biogenesis. In: *Cell Biol. Monographs*. Wien; New York: Springer-Verlag. 12 : 1—268.
- Hernandez-Verdun D. 2004. Behavior of the nucleolus during mitosis. In: *The nucleolus*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 41—57.
- Hernandez-Verdun D. 2006. Nucleolus: from structure to dynamics. *Histochem. Cell Biol.* 125 : 127—137.
- Hernandez-Verdun D., Gautier T. 1994. The chromosome periphery during mitosis. *BioEssays*. 16 : 179—185.
- Hernandez-Verdun D., Roussel P., Gebrane-Younes G. 2002. Emerging concepts of nucleolar assembly. *J. Cell Sci.* 115 : 2265—2270.
- Hozak P., Zatssepina O., Vasilyeva I., Chentsov Y. 1986. An electron microscopic study of nucleolus-organizing regions at some stages of the cell cycle (G₀ period, G₂ period, mitosis). *Biol. Cell*. 57 : 197—205.
- Hsu T. C., Arrighi F. E., Klevecz R. R., Brinkley B. R. 1965. The nucleoli in mitotic divisions of mammalian cells *in vitro*. *J. Cell Biol.* 26 : 539—553.
- Huang S. 2002. Building an efficient factory: where is pre-rRNA synthesized in the nucleolus? *J. Cell Biol.* 157 : 739—741.
- Hugle B., Hazan R., Scheer U., Franke W. W. 1985. Localization of ribosomal protein S1 in the granular component of the interphase nucleolus and its distribution during mitosis. *J. Cell Biol.* 100 : 873—886.
- Jiang P. S., Chang J. H., Yung B. Y. 2000. Different kinases phosphorylate nucleophosmin/B23 at different sites during G₂ and M phases of the cell cycle. *Cancer Lett.* 153 : 151—160.
- Jiménez-García L. F., Rothblum L. I., Busch H., Ochs R. L. 1989. Nucleologenesis: use of non-isotopic *in situ* hybridization and immunocytochemistry to compare the localization of rDNA and nucleolar proteins during mitosis. *Biol. Cell*. 65 : 239—246.
- Jiménez-García L. F., Segura-Valdez M. L., Ochs R. L., Rothblum L. I., Hannan R., Spector D. L. 1994. Nucleologenesis: U3 snRNA-containing prenucleolar bodies move to sites of active pre-rRNA transcription after mitosis. *Mol. Biol. Cell*. 5 : 955—966.
- Jordan E. G., McGovern J. H. 1981. The quantitative relationship of the fibrillar centres and other nucleolar components to changes in growth conditions, serum deprivation and low doses of actinomycin D in cultures diploid human fibroblasts (strain MRC-5). *J. Cell Sci.* 52 : 373—389.
- Klein J., Grummt I. 1999. Cell cycle-dependent regulation of RNA polymerase I transcription: the nucleolar transcription factor UBF is inactive in mitosis and early G₁. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 96 : 6096—6101.
- Koberna K., Malinsky J., Pliss A., Masata M., Vecerova J., Fialova M., Bednar J., Raska I. 2002. Ribosomal genes in focus: new transcripts label the dense fibrillar components and form clusters indicative of «Christmas trees» *in situ*. *J. Cell Biol.* 157 : 743—748.
- Lafontaine J. G. 1958. Structure and mode of formation of the nucleolus in meristematic cells of *Vicia faba* and *Allium cepa*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4 : 777—784.
- Lafontaine J. G., Chouinard L. A. 1963. A correlated light and electron microscope study of the nucleolar material during mitosis in *Vicia faba*. *J. Cell Biol.* 17 : 167—201.
- Lafontaine D. L., Tollervey D. 2001. The function and synthesis of ribosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2 (7) : 514—520.
- Le Panse S., Masson C., Heliot L., Chassery J.-M., Junera H. R., Hernandez-Verdun D. 1999. 3-D organization of single ribosomal transcription units after DRB inhibition of RNA polymerase II transcription. *J. Cell Sci.* 112 : 2145—2154.
- Leuch-Gaggl A., Haque J., Li J., Ning G., Traktman P., Duncan S. A. 2002. Pescadillo is essential for nucleolar assembly, ribosome biogenesis, and mammalian cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 277 : 45 347—45 355.
- Leung A. K., Gerlich D., Miller G., Lyon C., Lam Y. W., Lleres D., Daigle N., Zomerdijk J., Ellenberg J., Lamond A. I. 2004. Quantitative kinetic analysis of nucleolar breakdown and reassembly during mitosis in live human cells. *J. Cell Biol.* 166 : 787—800.
- Liu J., Maller J. L. 2005. *Xenopus* Polo-like kinase Plx1: a multifunctional mitotic kinase. *Oncogene*. 24 : 238—247.
- Louvet E., Junera H. R., Le Panse S., Hernandez-Verdun D. 2005. Dynamics and compartmentation of the nucleolar processing machinery. *Exp. Cell Res.* 304 : 457—470.
- Magoulas C., Zatssepina O. V., Jordan P. W., Jordan E. G., Fried M. 1998. The SURF-6 protein is a component of the nucleolar matrix and has a high binding capacity for nucleic acids *in vitro*. *Eur. J. Cell Biol.* 75 : 174—183.
- Medina F. J., Cerdido A., Fernandez-Gomez M. E. 1995. Components of the nucleolar processing complex (Pre-rRNA, fibrillar, and nucleolin) colocalize during mitosis and are incorporated to daughter cell nucleoli. *Exp. Cell Res.* 221 : 111—125.
- Morcillo G., De la Torre C. 1980. The effect of RNA synthesis inhibitors on prenucleolar bodies. *Experientia*. 36 : 836—837.
- Morcillo G., De la Torre C., Gimenez-Martin G. 1976. Nucleolar transcription during plant mitosis. *Exp. Cell Res.* 102 : 311—316.
- Mosgoeller W. 2004. Nucleolar ultrastructure in vertebrate. In: *The nucleolus*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 10—20.
- Nazar R. N. 2004. Ribosomal RNA processing and ribosome biogenesis in eukaryotes. *IUBMB Life*. 56 : 457—465.
- Niyya F., Xie X., Lee K. S., Inoue H., Miki T. 2005. Inhibition of cyclin-dependent kinase 1 induces cytokinesis without chromosome segregation in an ECT2 and MgcRacGAP-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 280 : 36 502—36 509.
- Noel J. S., Dewey W. C., Abel J. H., Thompson R. P. 1971. Ultrastructure of the nucleolus during the Chinese hamster cell cycle. *J. Cell Biol.* 49 : 830—847.
- Ochs R. L., Busch H. 1984. Further evidence that phosphoprotein C23 (110 kD/pI 5.1) is the nucleolar silver staining protein. *Exp. Cell Res.* 152 : 260—265.

- Ochs R. L., Lischwe M., O'Leary P., Busch H. 1983. Localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23 during mitosis. *Exp. Cell Res.* 146 : 139—149.
- Ochs R. L., Lischwe M. A., Shen E., Carroll R. E., Busch H. 1985a. Nucleologenesis: composition and fate of prenucleolar bodies. *Chromosoma.* 92 : 330—336.
- Ochs R. L., Lischwe M., Spohn W. N., Busch H. 1985b. Fibrillarin: a new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera. *Biol. Cell.* 54 : 123—133.
- Okuwaki M., Tsujimoto M., Nagata K. 2002. The RNA binding activity of a ribosome biogenesis factor, nucleophosmin/B23, is modulated by phosphorylation with a cell cycle-dependent kinase and by association with its subtype. *Mol. Biol. Cell.* 13 : 2016—2030.
- Olson M. O., Dunder M. 2005. The moving parts of the nucleolus. *Histochem. Cell Biol.* 123 : 203—216.
- Olson M. O., Hingorani K., Szébeni A. 2002. Conventional and nonconventional roles of the nucleolus. *Int. Rev. Cytol.* 219 : 199—266.
- Paweletz N., Risueño M. C. 1982. Transmission electron microscopic studies on the mitotic cycle of nucleolar proteins impregnated with silver. *Chromosoma.* 85 : 261—273.
- Peter M., Nakagawa J., Doree M., Labbe J. C., Nigg E. A. 1990. Identification of major nucleolar proteins as candidate mitotic substrates of cdc2 kinase. *Cell.* 60 : 791—801.
- Phillips S. G. 1972. Repopulation of the postmitotic nucleolus by preformed RNA. *J. Cell Biol.* 53 : 611—623.
- Piñol-Roma S. 1999. Association of nonribosomal nucleolar proteins in ribonucleoprotein complexes during interphase and mitosis. *Mol. Biol. Cell.* 10 : 77—90.
- Puvion-Dutilleul F., Mazan S., Nicoloso M., Pichard E., Bachellerie J.-P., Puvion E. 1992. Alterations of nucleolar ultrastructure and ribosome biogenesis by actinomycin D. Implications for U3 snRNP function. *Eur. J. Cell Biol.* 58 : 149—162.
- 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.
- Rubbi C. P., Milner J. 2003. Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. *EMBO J.* 22 : 6068—6077.
- Savino T. M., Bastos R., Jansen E., Hernandez-Verdun D. 1999. The nucleolar antigen Nop52, the human homologue of the yeast ribosomal RNA processing RRP1, is recruited at late stages of nucleologenesis. *J. Cell Sci.* 112 : 1889—1900.
- Savino T. M., Gebrane-Younes J., De Mey J., Sibarita J. B., Hernandez-Verdun D. 2001. Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells. *J. Cell Biol.* 153 : 1097—1110.
- Scheer U., Benavente R. 1990. Functional and dynamic aspects of the mammalian nucleolus. *BioEssays.* 12 : 14—21.
- Scheer U., Hock R. 1999. Structure and function of the nucleolus. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11 : 385—390.
- Scheer U., Hugle B., Hazan R., Rose K. M. 1984. Drug-induced dispersal of transcribed rRNA genes and transcriptional products: immunolocalization and silver staining of different nucleolar components in rat cells treated with 5,6-dichloro-beta-D ribofuranosylbenzimidazole. *J. Cell Biol.* 99 : 672—679.
- 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.
- Scheer U., Trendelenburg M. F., Franke W. W. 1975. Effects of actinomycin D on the association of newly formed ribonucleoproteins with the cistrons of ribosomal RNA in *Triturus* oocytes. *J. Cell Biol.* 65 : 163—179.
- Sirri V., Hernandez-Verdun D., Roussel P. 2002. Cyclin-dependent kinases govern formation maintenance of the nucleolus. *J. Cell Biol.* 156 : 969—981.
- Sirri V., Roussel P., Hernandez-Verdun D. 1999. The mitotically phosphorylated form of the transcription termination factor TTF-1 is associated with the repressed rDNA transcription machinery. *J. Cell Sci.* 112 : 3259—3268.
- Sirri V., Roussel P., Hernandez-Verdun D. 2000. *In vivo* release of mitotic silencing of ribosomal gene transcription does not give rise to precursor ribosomal RNA processing. *J. Cell Biol.* 148 : 259—270.
- Smetana K., Busch H. 1974. The nucleolus and nucleolar DNA. IN: The cell nucleus. New York: Acad. Press. 73—147.
- 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. New York: CRC Press. 469—490.
- Stevens B. 1965. The fine structure of the nucleolus during mitosis in the grasshopper neuroblast cell. *J. Cell Biol.* 24 : 349—368.
- Stockert J. C., Fernandez-Gomez M. E., Gimenez-Martin G., Sanchez-Lopez J. F. 1970. Organization of argyrophilic nucleolar material throughout the division cycle of meristematic cells. *Protoplasma.* 69 : 265—278.
- Tamm I., Hand R., Caliguiri L. A. 1976. Action of dichlorobenzimidazole riboside on RNA synthesis in L-929 and HeLa cells. *J. Cell Biol.* 69 : 229—240.
- Thiry M., Lafontaine D. L. 2005. Birth a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. *Trends Cell Biol.* 15 : 194—199.
- Tokuyama Y., Horn H. F., Kawamura K., Tarapore P., Fukasawa K. 2001. Specific phosphorylation of nucleophosmin on Thr(199) by cyclin-dependent kinase 2-cyclin E and its role in centrosome duplication. *J. Biol. Chem.* 276 : 21 529—21 537.
- Tschochner H., Hurt E. 2003. Pre-ribosomes on the road from the nucleus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol.* 13 : 255—263.
- Vandelaer M., Thiry M. 1998. The phosphoprotein pp135 is an essential constituent of the fibrillar components of nucleoli and of coiled bodies. *Histochem. Cell Biol.* 110 : 169—177.
- Verheijen R., Kuijpers H. J. H., van Driel R., Beck J. L. M., van Dierendonck J. H., Brakenhoff G. J., Ramaekers F. C. S. 1989. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. *J. Cell Sci.* 92 : 531—540.
- Voit R., Hoffmann M., Grummt I. 1999. Phosphorylation by G1-specific cdk-cyclin complexes activates the nucleolar transcription factor UBF. *EMBO J.* 18 : 1891—1899.
- Weisenberger D., Scheer U. 1995. A possible mechanism for the inhibition of ribosomal RNA gene transcription during mitosis. *J. Cell Biol.* 129 : 561—575.
- Weisenberger D., Scheer U., Benavente R. 1993. The DNA topoisomerase I inhibitor camptothecin blocks postmitotic reformation of nucleoli in mammalian cells. *Eur. J. Cell Biol.* 61 : 189—192.
- Yasuda Y., Maul G. G. 1990. A nucleolar auto-antigen is part of a major chromosomal surface component. *Chromosoma.* 99 : 152—160.
- Zatsepina O. V., Dudnic O. A., Chentsov Y. S., Thiry M., Spring H., Trendelenburg M. F. 1997a. Reassembly of functional nucleoli following *in situ* unraveling by low-ionic-strength treatment of cultured mammalian cells. *Exp. Cell Res.* 233 : 155—168.
- Zatsepina O. V., Dudnic O. A., Todorov I. T., Thiry M., Spring H., Trendelenburg M. F. 1997b. Experimental induction of prenucleolar bodies (PNBs) in interphase cells: interphase PNBs show similar characteristics as those typically observed at telophase of mitosis in untreated cells. *Chromosoma.* 105 : 418—430.
- Zatsepina O. V., Hozak P., Babajanyan D., Chentsov Y. 1988. Quantitative ultrastructural study of nucleolus-organizing regions at some stages of the cell cycle (G₀-period, G₂-period, mitosis). *Biol. Cell.* 62 : 211—218.
- Zatsepina O. V., Schofer C., Weipoltshammer K., Mosgoeller W., Almeder M., Stefanova V. N., Jordan E. G., Wachtler F. 1996. The RNA polymerase I transcription factor UBF and rDNA are located at the same major sites in both interphase and mitotic pig embryonic kidney (PK) cells. *Cytogenet. Cell Genet.* 73 : 274—278.
- Zatsepina O. V., Todorov I. T., Philipova R. N., Krachmarov C. P., Trendelenburg M. F., Jordan E. G. 1997c. Cell cycle-de-

pendent translocations of a major nucleolar phosphoprotein, B23, and some characteristics of its variants. *Eur. J. Cell Biol.* 73 : 58—70.

Zatsepina O. V., Voit R., Grummt I., Spring H., Semenov M. V., Trendelenburg M. F. 1993. The RNA polymerase I-specific transcription initiation factor UBF is associated with transcriptionally active and inactive ribosomal genes. *Chromosoma.* 102 : 599—611.

Zhang H., Shi X., Paddon H., Hampong M., Dai W., Pelech S. 2004. B23/nucleophosmin serine 4 phosphorylation mediates mitotic functions of polo-like kinase 1. *J. Biol. Chem.* 279 : 35 726—35 734.

Zhu Y., Lu D., DiMario P. 1999. Nucleolin, defective for MPF phosphorylation, localizes normally during mitosis and nucleologenesis. *Histochem. Cell. Biol.* 111 : 477—487.

Поступила 29 XI 2006

DYNAMICS AND MECHANISMS OF THE NUCLEOLUS REORGANIZATION DURING MITOSIS

O. O. Zharskaya,¹ O. V. Zatsepina^{1,2}

¹ M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, and ² A. N. Belozersky Institute of Physical and Chemical Biology, Moscow State University; e-mail: zatsepina@ibch.ru

The nucleolus is the largest and most dynamic nuclear domain in the vast majority of eukaryotic cells. The main and universal nucleolar function is participation in ribosome biogenesis, including ribosomal DNA (rDNA) transcription, pre-rRNA processing and ribosome subunit assembly. Furthermore, the nucleolus and its proteins also participate in cell cycle regulation, apoptosis and cell aging. These nucleolar functions are realized predominantly in interphase and, apparently, are abolished during mitosis, when the nucleolus disassembles. In this review, literature and our own data on the dynamics and mechanisms of the nucleolus disassembly and reassembly during mitosis in animal and plant cells are summarized. Particular attention is paid to the results obtained by analysis of the nucleolar dynamics in living cells and to modeling of the premature assembly of nucleolus upon various experimental conditions.

The work was supported by the Russian Foundation for Basic Researches (grant 06-04-49392) and program RAS «Molecular and Cell Biology».

Key words: nucleolus, mitosis, mechanisms of disassembly and reassembly, peripheral chromosomal material, nucleolus derived foci, prenucleolar bodies, methods of analysis.