

ТРЕХМЕРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ИНТЕРФАЗНЫХ ЯДЕР ФИБРОБЛАСТОВ У ДВУХ БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ ВИДОВ БУРОЗУБОК, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ СТРУКТУРОЙ ТЕРМИНАЛЬНЫХ РАЙОНОВ ХРОМОСОМ

© Н. Б. Рубцов, Т. В. Карамышева, Ю. М. Минина, Н. С. Жданова¹

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск;
¹ электронный адрес: zhdanova@bionet.nsc.ru

Для изучения трехмерной организации интерфазных ядер у двух видов-близнецов млекопитающих — бурозубок *Sorex araneus* (раса Cordon) и *S. granarius* — были использованы флуоресцентная гибридизация *in situ* с ДНК-пробами к теломерной и рибосомной ДНК и иммунофлуоресценция с антителами к белку B23, являющемуся одним из белков ядрышка. Кариотипы этих видов составлены практически из идентичных хромосомных плеч, но различаются числом метацентрических хромосом и структурой терминальных районов хромосом. У *S. granarius* на концах коротких плеч 32 акроцентриков локализованы длинные теломеры, содержащие в среднем 218 тыс. пар нуклеотидов теломерного повтора. Часть теломерных повторов в них перемежается с рибосомными. В этих же районах были выявлены ЯО-районы. В отличие от *S. granarius* у *S. araneus* ЯО-районы локализованы на терминальных концах 8 хромосомных плеч (Zhdanova et al., 2005, 2007b). Для обоих видов бурозубок характерны ассоциация хромосом теломерными районами и контакт части теломерных кластеров с ядерной мембраной и с ядрышками. Кроме того, нами были выявлены солоколизация и частичное перекрывание кластеров теломерной и рибосомной ДНК, а также пространственная близость центромерных и теломерных районов хромосом в интерфазных ядрах *S. granarius*. Полученные данные указывают на то, что связь с ядрышком проявляют только те кластеры теломерной ДНК, в которых находится достаточное число рибосомных генов. Изучены процессы разборки ядрышка при переходе фибробластов к митотическому делению, продемонстрирована роль в этом процессе белка B23.

Ключевые слова: трехмерная организация фибробластов, бурозубки, теломеры, ядрышко, белок B23, центромеры.

Принятые сокращения: ЯО-районы — ядрышкообразующие районы хромосом, Ag-бэнды — районы хромосом, окрашивающиеся серебром, FISH — флуоресцентная гибридизация *in situ*.

Бурозубки *Sorex granarius* и *S. araneus* являются видами-близнецами, дивергировавшими несколько сотен лет тому назад (Taberlet et al., 1994). За исключением сдвига центромеры в одной из метацентрических хромосом, их кариотипы составлены из идентичных хромосомных плеч (Ye et al., 2006). *S. araneus* характеризуется большим числом хромосомных рас, сформировавшихся в результате Робертсоновских слияний, так что разные расы различаются числом и составом метацентрических хромосом. Раса Cordon характеризуется наиболее примитивным среди других рас кариотипом. Гаплоидный набор хромосом самки из расы Cordon состоит из 5 метацентриков и 10 акроцентриков. Гаплоидный набор хромосом самки *S. granarius* содержит 2 метацентрика, которые гомологичны метацентрикам *de* и *tu* *S. araneus*, и 16 акроцентриков (Wojcik et al., 2003). Однако, несмотря на очевидное сходство кариотипов *S. granarius* и *S. araneus* расы Cordon, они различаются только тремя Робертсоновскими слияниями — структура терминальных районов в их хромосомах существенно различается.

Терминальные районы хромосом *S. granarius* имеют необычную для хромосом млекопитающих организацию. У этого вида на концах коротких плеч 32 акроцентриков

локализованы длинные теломеры, содержащие до 300 тыс. пар нуклеотидов (т. п. н.) теломерного повтора (в среднем 218 т. п. н.), причем по крайней мере часть теломерных повторов в них чередуется с рибосомными. В этих же районах были выявлены позитивные Ag-бэнды, что указывает на возможность присутствия в них активных ЯО-районов. Остальные теломеры у этого вида небольшие, в среднем 3.6 т. п. н. В отличие от *S. granarius* у *S. araneus* ЯО-районы локализованы на концах длинных плеч восьми хромосом независимо от того, являются ли они в разных хромосомных расах акроцентриками или входят в состав метацентриков. Размер теломер у этого вида типичен для млекопитающих. В расе Cordon теломеры содержат в среднем 7.0—9.5 т. п. н. теломерного повтора (Zhdanova et al., 2005, 2007a, 2007b).

Известно, что теломерные, центромерные и ЯО-районы хромосом играют особую роль в архитектонике клеточного ядра (Dundr, Misteli, 2001; Weierich et al., 2003). В связи с этим мы провели сравнительный анализ пространственной организации интерфазных ядер первичных фибробластов *S. granarius* и *S. araneus* (хромосомная раса Cordon), используя трехмерную лазерную микроскопию интерфазных ядер после FISH с ДНК-пробами к теломер-

ной и рДНК, а также иммуноокрашивание антителами к белкам центромер и ядрышка. Для того чтобы выявить локализацию кластеров рДНК в ядрах, 3D-FISH проводили на препаратах, обработанных и не обработанных РНКазой А.

Материал и методика

Реактивы: олигонуклеотиды (ТТАГГГ)₅ и (ЦЦЦТАА)₅, био-16-дУТФ и набор реактивов для ник-трансляции (ООО Медиген, Россия); дигоксигенин-11-дУТФ (Roche, Германия); набор реактивов для ПЦР, формамид, Tris-HCl, Tris-основание, Тритон X-100, антитела ANA CREST, антитела козы к иммуноглобулинам человека, конъюгированные с Cy5, антитела мыши к белку B23 крысы и декстрансульфат (Sigma, Германия); антитела козы к иммуноглобулинам мыши, конъюгированные с FISH (Invitrogen, США); авидин-FISH (Vector, США); PBS в таблетках (Helicon, Россия); биотинилированные антитела мыши к авидину, конъюгированные с Alexa 488 (Invitrogen, США).

Клетки. Использовали фибробласты бурузубок на 3—10-м пассажах культивирования. Культивирование клеток проводили в CO₂-инкубаторе на покровных стеклах, помещенных в чашки Петри, до состояния редкого монослоя.

В качестве ДНК-пробы, специфичной теломерным последовательностям, использовали меченный биотином или дигоксигенином продукт полимеразной цепной реакции (ПЦР) в присутствии олигонуклеотидов (ТТАГГГ)₅ и (ЦЦЦТАА)₅ (Ijdo et al., 1991). Мечение ДНК осуществляли в дополнительных циклах ПЦР с добавлением био-16-дУТФ или дигоксигенин-11-дУТФ. В качестве ДНК-пробы для выявления рДНК использовали фрагмент 18S рДНК размером 3.2 т. п. н., клонированный в pHg13 (Мальгин и др., 1992). Мечение биотином или дигоксигенином проводили в реакции ник-трансляции.

Для выявления центромерных районов использовали антитела ANA CREST, а для визуализации ядрышек — антитела мыши к фосфопротеину B23 крысы.

FISH и иммуноокрашивание проводили так, как описано ранее (Solovei et al., 2002). Выращенные на покровных стеклах фибробласты бурузубок на 3—6-м пассажах фиксировали 4%-ным параформальдегидом в течение 10 мин. Затем обрабатывали 0.5%-ным раствором Тритона X-100 в течение 10 мин и на ночь помещали в фосфатный буферный раствор (если проводили иммуноокрашивание) или в 20%-ный раствор глицерина (pH 7.0) (если проводили FISH). Клетки, предназначенные для иммуноокрашивания, инкубировали сначала с антителами ANA CREST или антителами мыши к белку B23, а затем с соответствующими вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромами. Перед проведением FISH покровные стекла подвергали четырехкратному замораживанию—размораживанию в жидком азоте и инкубировали в 0.1 н. HCl в течение 5 мин. На ночь оставляли в 50%-ном формамиде в 2-кратном буфере SSC (pH 7.0). Совместную денатурацию ДНК интерфазных ядер фибробластов и ДНК-проб проводили при 75 °С в течение 5 мин в гибридационной смеси стандартного состава (50%-ный формамид, 2-кратный буфер SSC и 10%-ный декстрансульфат).

Для выявления кластеров рДНК покровные стекла перед гибридизацией обрабатывали РНКазой А в концент-

рации 0.1 мг/мл. В экспериментах, где проводили одновременную визуализацию антител и ДНК-проб, вначале проводили иммуноокрашивание, а затем FISH, как описано выше.

Лазерную сканирующую микроскопию проводили на LSM510META (ZEISS) в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск).

Результаты

Кластеры теломерных повторов в интерфазных ядрах первичных фибробластов *S. granarius* и *S. araneus*. В результате проведения FISH с теломерной пробой в ядрах *S. granarius* было выявлено от 7 до 24 варьирующих по размеру крупных блоков теломерных повторов (рис. 1). Поскольку у *S. granarius* с помощью использованной нами пробы детектируются длинные теломеры на коротких плечах акроцентрических хромосом (Zhdanova et al., 2005), число которых равно 32, полученные данные свидетельствуют о формировании в интерфазных ядрах ассоциаций коротких плеч акроцентриков. Возможно, что в этих ассоциациях принимают участие и короткие теломеры, характерные для метацент-

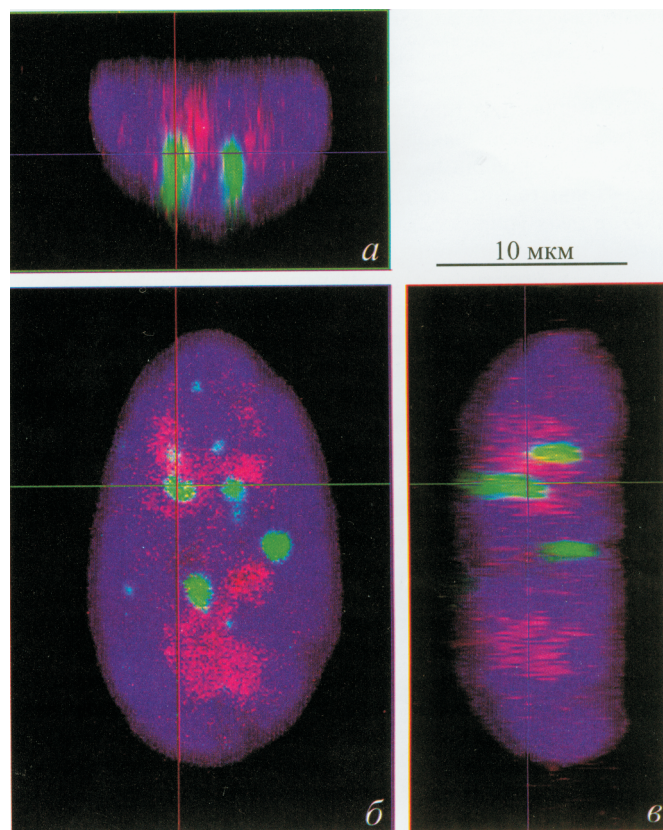


Рис. 1. Ортогональная проекция ядра фибробласта *Sorex granarius* после 3D-FISH с ДНК-пробой к теломерным последовательностям (цвет сигнала красный) и с рДНК-пробой (цвет сигнала зеленый).

Общая окраска ДНК красителем DAPI (синий сигнал). Оптический срез по плоскости XZ (а), плоскости XY (б) и плоскости YZ (в). Линии указывают на положение оптических срезов. Об. 100×. Условия сканирования: лазерные линии 405, 488 и 633; фильтры: BP 420—480 IR, LP 650 и BP 505—570; толщина оптического среза 0.6 мкм; шаг при сканировании 0.3 мкм.

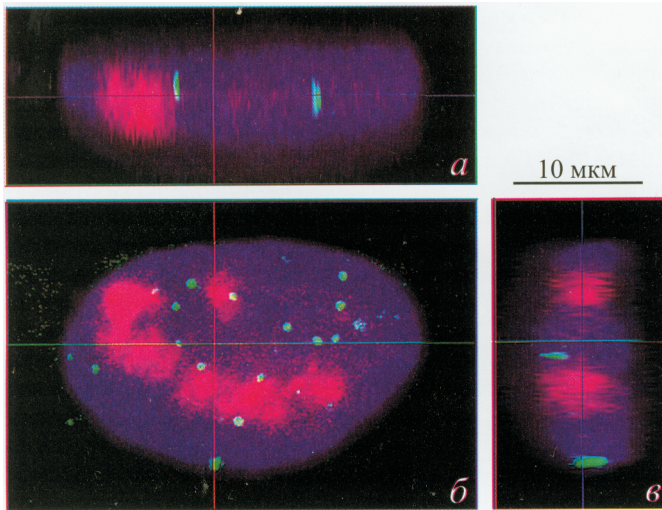


Рис. 2. Ортогональная проекция ядра фибробласта *Sorex araneus* (раса Cordon) после иммуноокрашивания с антителами к белку B23 (цвет сигнала красный) и 3D-FISH с пробой к теломерным последовательностям (цвет сигнала зеленый).

Общая окраска ДНК красителем DAPI (синий сигнал); оптический срез по плоскости XZ (а), плоскости XY (б) и плоскости YZ (в). Линии указывают на положение оптических срезов. Об. 100×. Условия сканирования: лазерные линии 405, 543 и 633; фильтры LP 420, LP 650 и BP 560—615; толщина оптического среза 0.9 мкм; шаг при сканировании 0.5 мкм; число срезов 19, представлен срез № 10.

риков и длинных плеч акроцентриков. В ядрах *S. araneus* из расы Cordon выявленные кластеры теломерной ДНК также варьировали по числу и размеру; однако размер их был значительно меньше, чем в ядрах фибробластов *S. granarius* (рис. 1, 2). Эти результаты хорошо согласуются с полученными ранее данными о том, что размер теломер у *S. araneus* в 20 раз меньше, чем длинных теломер у *S. granarius*. Число выявленных кластеров теломерной ДНК в ядрах *S. araneus* варьировало от 9 до 38, что существенно меньше числа теломер у этого вида. Таким образом, в интерфазных ядрах бурозубок значительное число хромосом ассоциировано терминальными районами.

У бурозубок около 80 % выявленных кластеров теломерной ДНК находилось в непосредственной близости к оболочке ядра (рис. 1). Разрешение использованной лазерной сканирующей микроскопии (размер воксела около

200 нм по осям X и Y и около 600 нм по оси Z) не позволяет утверждать, что эти кластеры находятся в непосредственном контакте с ядерной оболочкой. Более того, уплощенная форма интерфазных ядер фибробластов в сочетании с крупными размерами теломерных кластеров в ядрах *S. granarius* создавала дополнительные проблемы в оценке положения кластера теломер относительно ядерной оболочки. Большой размер таких кластеров у *S. granarius* иногда позволял им «контактировать» как с верхней, так и с нижней поверхностями ядер. Вероятно, в ряде случаев регистрируемые «контакты» являлись результатом недостаточного разрешения лазерной сканирующей микроскопии, но все же мы полагаем, что значительное число выявленных «контактов» представляло собой реальные контакты кластеров теломерных районов и оболочки ядра.

Локализация центромерных районов хромосом *S. granarius*. Одновременное выявление кластеров теломерной ДНК и центромерных районов хромосом с помощью FISH с ДНК-пробой к теломерной ДНК и иммуноокрашивания ANA CREST выявило совместную локализацию соответствующих сигналов в интерфазных ядрах (рис. 3). Данные свидетельствуют о том, что перичентромерные районы акроцентриков и локализованные на коротких плечах этих хромосом длинные теломеры в интерфазных ядрах пространственно сближены. Возможно, то, что мы называем короткими плечами акроцентриков, у *S. granarius* содержат теломерную и рибосомную ДНК, непосредственно прилегающие к перичентромерным районам этих хромосом. Схожая структура проксимальных районов акроцентриков была недавно описана у мыши (Kalitsis et al., 2006).

Кластеры теломерной ДНК и ядрышки. Двухцветная FISH с теломерной пробой и пробой к рДНК, а также с теломерной пробой и антителами к B23-белку ядрышка позволила провести анализ пространственного распределения материала теломер, рДНК и некоторых белков ядрышек в ядрах фибробластов у исследованных видов бурозубок и проследить взаимосвязь между ядрышками и терминальными районами хромосом (рис. 1, 2, 4, 5). Напоминаем, что для бурозубок характерна терминальная локализация ЯО-районов, однако число ЯО-районов и характер их распределения по концам хромосом у *S. granarius* и *S. araneus* существенно различаются.

FISH с рДНК-пробой и иммуноокрашивание антителами к белку B23 выявили в ядрах бурозубок крупные ло-

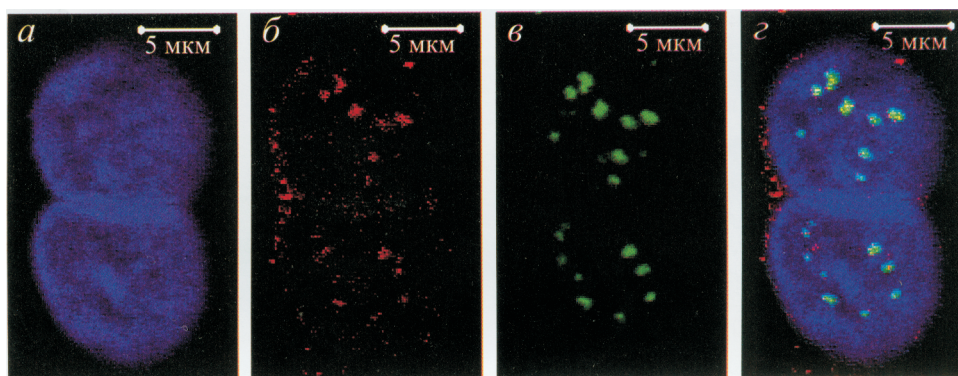


Рис. 3. Оптический срез ядра фибробласта *Sorex granarius* после 3D-FISH с пробой к теломерным последовательностям (б, красный сигнал) и с иммуноокрашиванием ANA CREST (в, зеленый сигнал).

а — общая окраска ДНК красителем DAPI (синий сигнал), г — совмещение изображений. Об. 63×. Условия сканирования: лазерные линии 405, 543 и 633; фильтры BP 420—480 IR, LP 560 и LP 650; толщина оптического среза 0.6 мкм; шаг при сканировании 0.3 мкм; число срезов 41, представлен срез № 22.

пастные ядрышки (рис. 2, 4, 5). Если по размеру теломерных кластеров можно было безошибочно дифференцировать ядра изучаемых видов, то по размеру ядрышек они оказались очень близкими. Оба вида характеризовались крупными ядрышками и большим количеством рРНК. Возможно, что большое количество рРНК в клетках бурозубок связано с высокой интенсивностью обменных процессов у этих видов. В результате проведения трехмерной реконструкции по данным конфокальной микроскопии были зарегистрированы случаи, когда кластеры теломерной ДНК были практически полностью погружены в ядрышко (рис. 5). В других случаях теломерные кластеры и ядрышки просто находились в контакте. К сожалению, разрешение стандартной лазерной сканирующей микроскопии не позволяет провести анализ структурной организации места контакта теломер и ядрышек. Чередование в коротких плечах трэков теломерных повторов и рДНК (Zhdanova et al., 2007b) позволяет предположить два возможных варианта структурной организации: 1) теломерная ДНК компактно локализована на границе ядрышка, участвуя в его пространственном выделении из остальной части ядра, в то время как петли рДНК уходят непосредственно в ядрышко; 2) петли теломерной ДНК вместе с рДНК находятся внутри ядрышка. Результаты конфокальной микроскопии позволяют рассматривать предположение о локализации теломерной ДНК преимущественно на границе ядрышек более вероятным.

Следует также отметить, что во всех исследованных ядрах лишь часть выявленных кластеров теломерной ДНК находилась в контакте с ядрышками, выявленными иммуноокрашиванием антителами к белку B23. У *S. araneus* в контакте с ядрышками находились не более 8 теломер. Это совпадает с числом активных ЯО-районов хромосом у этого вида, выявленных при Ag-NOR-окрашивании. Более сложная картина была обнаружена у *S. granarius*. У этого вида последовательности рДНК либо перемежаются с теломерными последовательностями крупных теломерных районов, либо непосредственно прилегают к ним в 32 районах хромосом. В этих же районах были выявлены Ag-NOR-позитивные бэнды. Однако при анализе пространственной организации ядер фибробластов было показано, что в контакте с ядрышками находилось не более 12 теломерных кластеров. Встречались клетки, в ядрах которых в контакте с ядрышком находились лишь два теломерных кластера, в то время как остальные были локализованы от него на значительном расстоянии. По-видимому, связь с ядрышком имеют в основном те теломерные районы, в состав которых входят активные рибосомные гены. Однако нельзя исключить, что в контакте с ядрышками могут находиться и теломерные районы, не содержащие ни активных генов рДНК, ни даже ДНК, имеющей частичную гомологию рДНК. Такие районы могут оказаться в контакте с ядрышками за счет формирования ими ассоциаций с теломерными районами, несущими активные гены рДНК.

Предположение о том, что по крайней мере часть неактивных или частично дегенерированных генов рДНК может не участвовать в формировании ядрышек, полностью согласуется с результатами анализа солокализации в интерфазных ядрах теломерных кластеров и рДНК, полученных с помощью двухцветной 3D-FISH ДНК-проб, выявляющих рибосомную и теломерную ДНК. После обработки РНКазой двухцветная FISH в ядрах *S. granarius* выявляла солокализацию или как минимум частичное перекрывание сигналов, соответствующих теломерной и

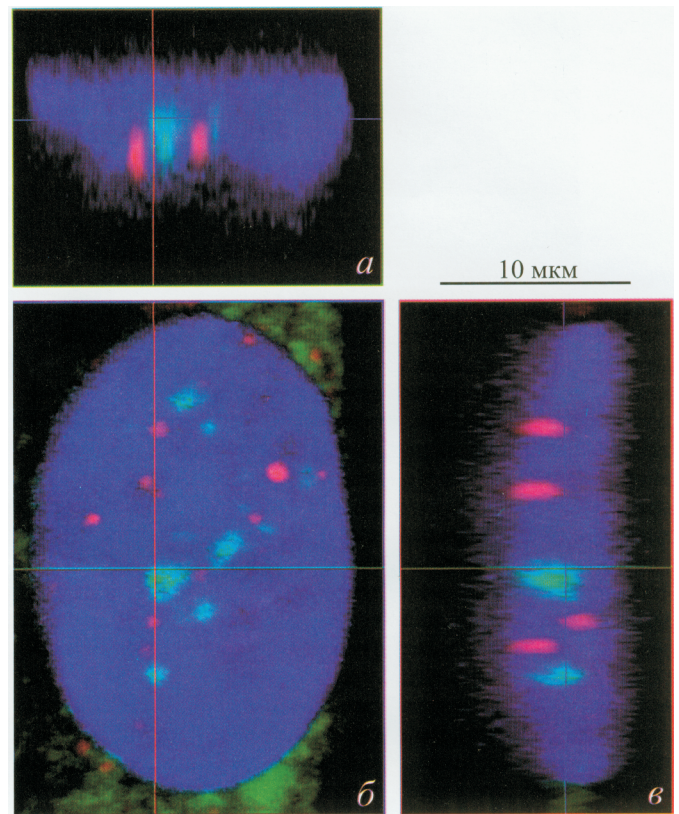


Рис. 4. Ортогональная проекция ядра фибробласта *Sorex granarius* после иммуноокрашивания с антителами к белку B23 (сигнал красный) и 3D-FISH с пробой к теломерным последовательностям (сигнал зеленый).

Общая окраска ДНК красителем DAPI (синий сигнал). Оптический срез по плоскости XZ (а), плоскости XY (б) и плоскости YZ (в). Линии указывают на положение оптических срезов. Об. 100×. Условия сканирования: лазерные линии 405, 488 и 633; фильтры LP 420, BP 505—530 и LP 650; толщина оптического среза 0.9 мкм; шаг при сканировании 0.5 мкм; число срезов 21, представлен срез № 11.

рДНК. Структур, напоминающих ядрышки, выявлено не было (рис. 6). Следует учитывать, что сигнал FISH рДНК-пробы с отдельными нитями рДНК внутри ядрышек может оказаться слишком слабым из-за низкой концентрации. Выявленные же сигналы рДНК, солокализованные с кластерами теломер или расположенные в контакте с ними, могут соответствовать оставшейся компактизированной ДНК теломерных районов, содержащей либо неактивные, либо неполноценные гены рибосомной ДНК. Возможно, этот материал совместно с теломерной ДНК участвует в структурной организации ядрышек, создавая специфический компартмент на их границе.

Динамика сборки—разборки ядрышек фибробластов у бурозубок. Иммуноокрашивание антителами к белку B23 и 3D-микроскопия клеток, находящихся на разных стадиях клеточного цикла, позволили проследить за динамикой сборки—разборки ядрышек при прохождении клетками митоза. В интерфазных ядрах мы наблюдали равномерное и интенсивное окрашивание ядрышек. Исключение составляли отдельные клетки, в которых интерфазные ядра были окрашены практически полностью. Неокрашенной оставалась лишь небольшая часть прилегающей к ядерной оболочке нуклеоплазмы.

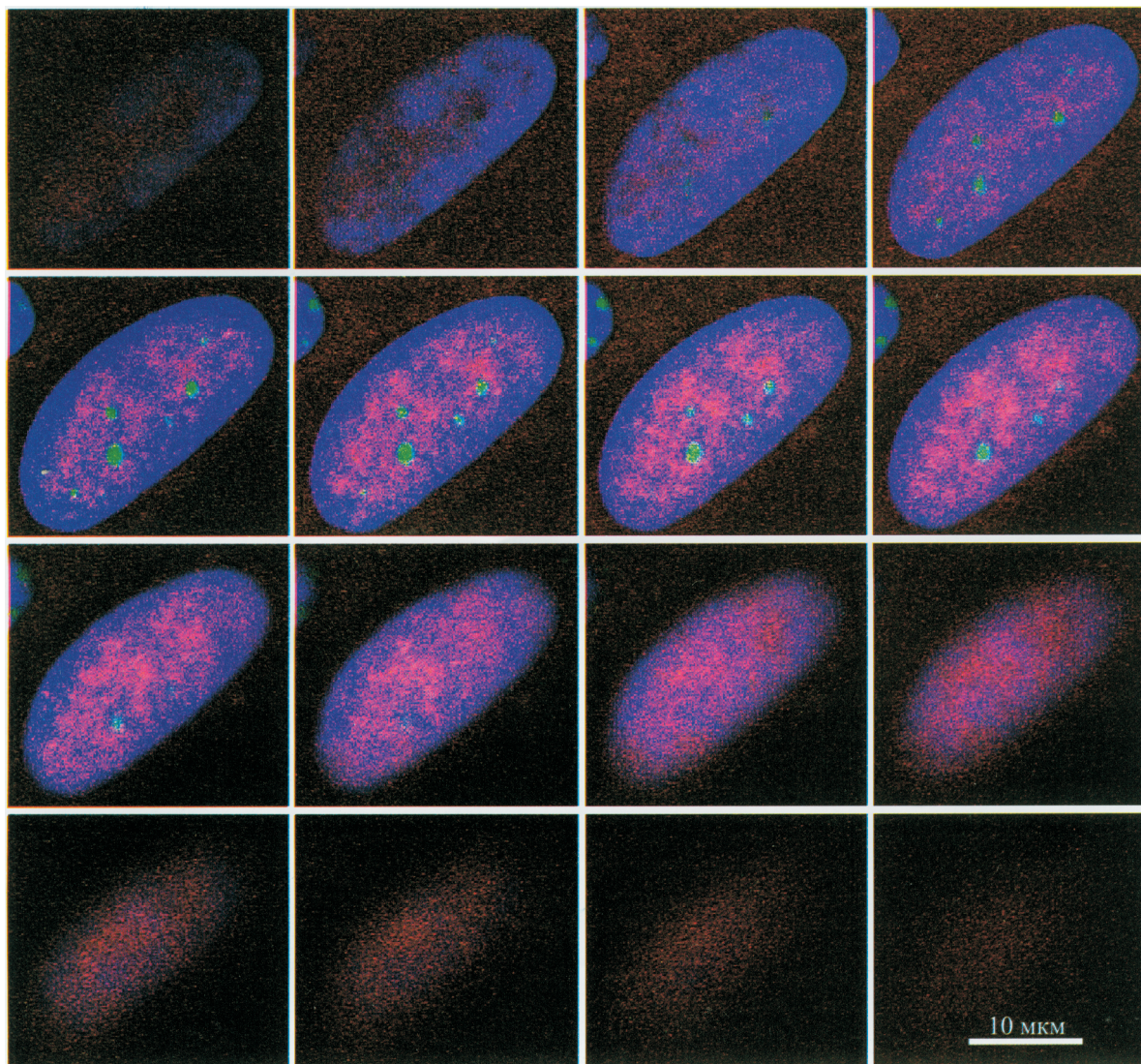


Рис. 5. Частичная галерея срезов ядра фибробласта *Sorex granarius* после иммуноокрашивания с антителами к белку B23 (сигнал красный) и 3D-FISH с пробой к теломерным последовательностям (сигнал зеленый).

Общая окраска ДНК красителем DAPI (синий сигнал). Об. 100×. Условия сканирования: лазерные линии 405, 488 и 633; фильтры LP 420, BP 505—530 и LP 650; толщина оптического среза 0.9 мкм; шаг при сканировании 0.5 мкм.

В этих клетках интенсивность окраски существенно варьировала в разных областях ядра (рис. 5). Из-за нерешенной проблемы идентификации конкретной стадии интерфазы реорганизация ядрышек в этой фазе клеточного цикла осталась неизученной. В митотических клетках бурозубок наблюдался распад ядрышек, а в дочерних клетках — их восстановление. Возможно, что клетки, ядра которых были окрашены практически полностью при использовании анти-B23-антител, находились либо на начальных стадиях формирования нормальной структуры интерфазного ядра после завершения клеточного деления, либо в самом конце интерфазы. Следует отметить, что в других исследованных культурах клеток, например в эмбриональных стволовых клетках человека, мы не наблюдали такого распределения белка B23 в интерфазных ядрах.

Перераспределение белка B23 наиболее четко происходило при вхождении клетки в митоз. На ранних стадиях митоза повышалась концентрация белка B23 в межхроматиновом пространстве, который затем оказывался локали-

зованным преимущественно в перихромосомном слое митотических хромосом (рис. 7). При окончании митоза и формировании в дочерних клетках ядер наблюдалась обратная картина: сначала повышалась концентрация белка B23 в межхроматиновом пространстве, а затем он оказывался собранным в формирующихся ядрышках.

Обсуждение

В настоящее время интерфазное ядро можно представить как совокупность отдельных компартментов, которые характеризуются присутствием в них специальных наборов белков и определенного рода РНК и ДНК. В отличие от цитоплазматических органелл они не содержат ограничивающих их мембран и представляют собой динамические ядерными компартментами являются ядрышки и хромосомные территории. Участие отдельных районов хромосом в формировании и поддержании ядрышек,

по-видимому, во многом определяет структуру интерфазных ядер.

Одним из важных компонентов ядрышка является фосфопротеин B23 (нуклеофосмин). Являясь мультифункциональным белком, он участвует в биогенезе рибосом (Negi, Olson, 2006). Было установлено, что, несмотря на то что для белка B23 характерна высокая скорость обмена между ядрышком и нуклеоплазмой, в интерфазных ядрах он сконцентрирован в основном в ядрышках (Chen, Huang, 2001), в их фибриллярном и гранулярном компонентах (Mukharyamova et al., 1999; Martin et al., 2007). В силу этого он может быть использован в качестве маркера в исследованиях пространственной организации ядрышка.

Изучая трехмерную организацию интерфазных ядер бурозубок с помощью антител к белку B23, мы показали, что при вхождении фибробластов в митоз, дезинтеграции ядрышек и поступлении их материала в межхромосомное пространство происходит транслокация белка B23 в перихромосомный слой. Эти данные подтверждают полученные ранее с помощью обычной световой микроскопии опухолевых и трансформированных клеток. В этих работах было показано, что после распада ядрышек наблюдается перемещение их компонентов, в том числе и белка B23, в цитоплазматические дериваты ядрышка и в перихромосомный слой (Dundr et al., 1997; Mukharyamova et al., 1999; Жарская, Зацепина, 2007). Недавно была выявлена роль в этом процессе фосфорилирования белка B23 (Negi, Olson, 2006). По-видимому, таким способом обеспечиваются сохранение и доставка компонентов ядрышка в соответствующие компартменты дочерних клеток, где они вновь используются при сборке ядрышек.

Локализация ЯО-районов в хромосомах большого числа видов млекопитающих показала, что для них наиболее характерна либо терминальная локализация, либо локализация в районе границы блоков прицентромерного гетерохроматина. Реже встречаются ЯО-районы, локализованные внутри эухроматиновых плеч хромосом. Примером последнего может служить локализация ЯО-района в середине р-плеча хромосомы 8 американской норки. Следует, однако, отметить, что именно этот район является границей, делящей 8p американской норки на два участка, которые у человека представлены коротким и длинным плечами хромосомы 17, а у лисицы разнесены в разные хромосомы (VVU2 и VVU12) (Rubtsov et al., 2000).

В отношении локализации ЯО-районов изучаемые виды бурозубок явились типичными представителями млекопитающих. У *S. araneus* ЯО-районы локализованы в терминальных районах 8 хромосомных плеч независимо от того, являются они акроцентриками или входят в состав метацентриков в разных хромосомных расах, т. е. у этого вида они находятся на огромном расстоянии от центромерного района. У *S. granarius*, напротив, ЯО-районы локализованы в коротких плечах 32 акроцентрических хромосом. Ранее мы показали, что на хромосомах этих видов ЯО-районы непосредственно прилегают к теломерам, а в проксимальной части длинных теломер акроцентриков *S. granarius* теломерные повторы перемежаются с рибосомными, образуя единый терминальный домен (Zhdanova et al., 2005, 2005a, 2007b). Полученные при изучении трехмерной организации интерфазных ядер бурозубок данные подтверждают этот вывод и свидетельствуют о том, что в интерфазных ядрах *S. granarius* кластеры теломерной и рибосомной ДНК также пространственно сближены.

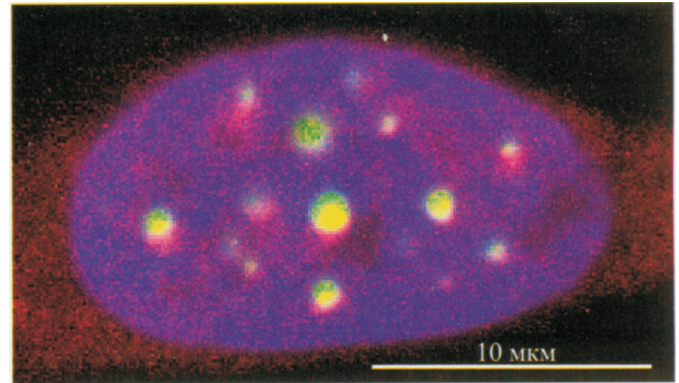


Рис. 6. Оптический срез (0,6 мкм) ядра фибробласта *Sorex granarius* после 3D-FISH с биотинилированной пробой к теломерным последовательностям (сигнал зеленый) и с пробой к 18S рДНК (сигнал красный).

Окраска DAPI синего цвета. Об. 100×. Условия сканирования: лазерные линии 405, 488 и 543; фильтры BP 420—480 IR, BP 505—530 и BP 560—615.

S. araneus и *S. granarius* характеризуются четырехкратными различиями в числе активных ЯО-районов, выявляемых на хромосомах с помощью как FISH, так и окраски серебром (Zhdanova et al., 2007b). В то же время их клетки содержат сопоставимое количество рДНК. Вероятно, значительная часть рДНК у *S. granarius*, возникшая в результате глобальной реорганизации теломерных районов, либо неактивна, либо функционально неполноценна. Возможно, что выявляемая FISH ДНК как рДНК либо представлена фрагментами рибосомных генов, либо инактивирована каким-то неизвестным механизмом. Полученные недавно данные указывают на то, что формирование терминальных районов коротких плеч акроцентриков проходило в результате рекомбинации хромосомных плеч (Жданова и др., 2007). В связи с этим более логично предположить, что большая часть «избыточной рДНК» может представлять собой несовершенные копии рибосомных генов.

В настоящее время накапливается все больше данных, указывающих на коэволюцию теломерных и рибосомных повторов (Meayne et al., 1990; Dobjigny et al., 2003), а также на наличие структурной и функциональной связи между ядрышками и теломерами. Описаны виды растений, у которых рибосомные повторы выполняют функцию теломерных (Fajkus et al., 2005). Кроме того, было показано, что теломерные последовательности могут быть стабильно связаны со скелетом ядрышка (Weipoltschammer et al., 1999). И хотя связь между теломерной ДНК и ДНК, входящей в состав ядрышка, неясна, предполагается, что теломерная ДНК может играть некую структурно-функциональную роль в формировании ядрышка (Liu, Fredga, 1999; Weipoltschammer et al., 1999). Наиболее интригующими являются полученные недавно данные, свидетельствующие о том, что в клетках млекопитающих между ядрышком и теломерой существует функциональная связь, описанная ранее для клеток дрожжей (Johnson et al., 1998). Было показано, что в ядрышках содержатся факторы, необходимые для функционирования теломер, такие как TRF2 (Zhang et al., 2004), играющий важную роль в поддержании длины теломер, и теломеразы, обеспечивающая репликацию теломер. Теломераза была выявлена в ядрышке в основном на G₁- и S-стадиях клеточ-

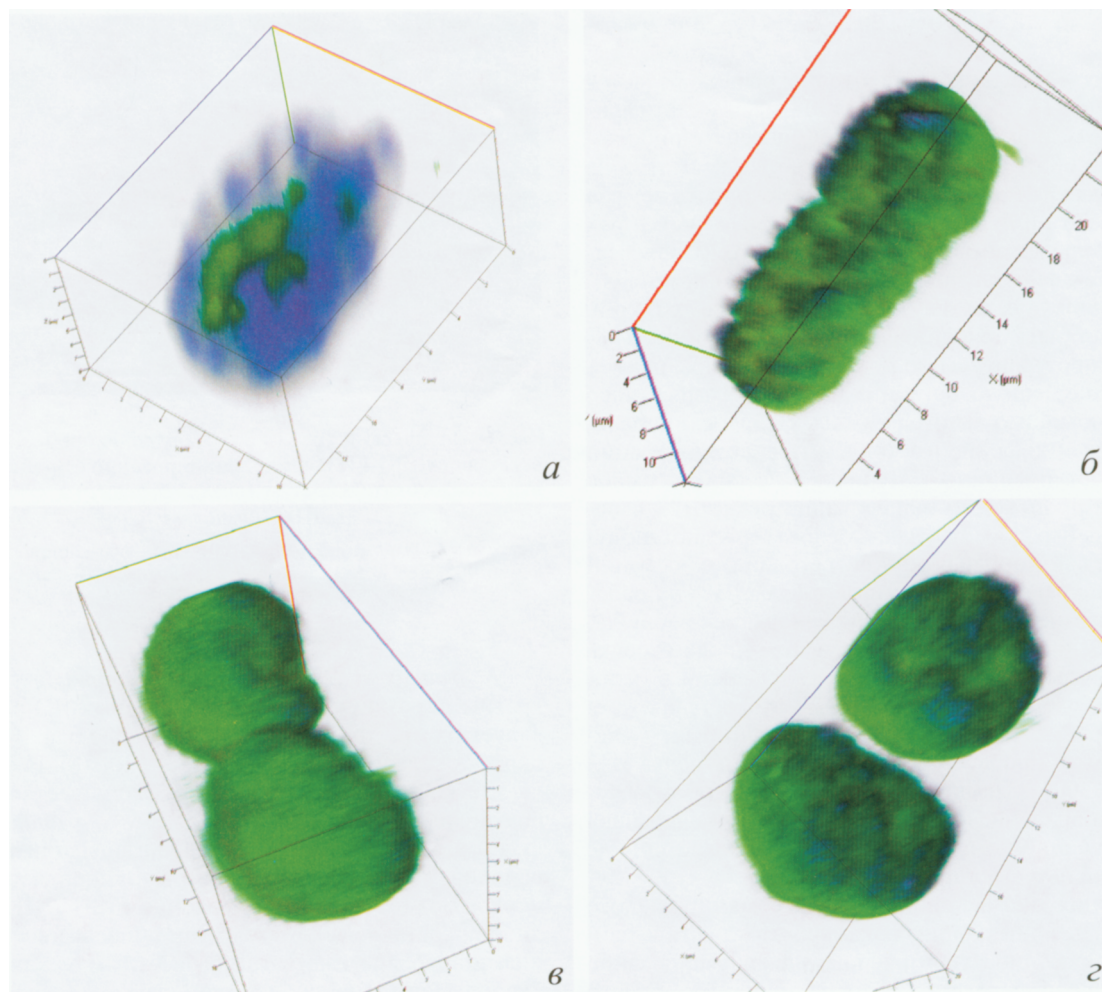


Рис. 7. Трехмерная реконструкция локализации белка B23 (зеленый сигнал) в делящихся клетках *Sorex granarius*: в межхроматиновом пространстве в профазе (а), в перихромосомном слое в митозе (б) и анафазе (в, г).

Общая окраска ДНК красителем DAPI (синий сигнал). Об. 100×. Условия сканирования: лазерные линии 405 и 488; фильтры LP 420 и BP 505—530; толщина оптических срезов 0.9 мкм; шаг при сканировании 0.5 мкм.

ного цикла. РНК-субъединица теломеразы образовывала комплекс с короткими РНК ядрышка (snoRNA) типа H/ACA (Narayanan et al., 1999; Dunhr, Misteli, 2001), а обратная транскриптаза связывалась с одним из главных белков ядрышка — нуклеолином (белок C25) (Khurts et al., 2004).

В трансформированных и опухолевых клетках, для которых характерны резкие нарушения в длине теломер, связь теломеразы с ядрышками была нарушена (Wong et al., 2002). Неясно, играют ли эти факторы, столь необходимые для функционирования теломер, какую-либо роль в функционировании самого ядрышка, однако складывается впечатление, что ядрышко — это та органелла, которая связывает и(или) сохраняет некоторые теломерные факторы и регулирует их поступление в теломеры в зависимости от стадии клеточного цикла (Zhang et al., 2004). Таким образом, ядрышко может играть координирующую роль по отношению к функционирующей теломере, и тогда приближение ЯО-районов к теломерам может быть не случайным (оправданным). Именно такой случай мы наблюдаем, по-видимому, у землероек, у которых ЯО-районы и теломеры находятся в непосредственной близости друг к другу, так что в некоторых теломерах рибосомные повторы выявляются непосредственно в теломерах.

Согласно полученным нами данным, для части теломерных кластеров в ядрах бурозубок характерен контакт с ядерной мембраной. Возможно, что это обусловлено частичной акроцентрической организацией хромосом. Для большинства исследованных видов типична локализация центромер в непосредственной близости к оболочке ядра, в то время как теломеры у этих видов могут быть распределены по всему пространству ядра (Weierich et al., 2003). Так, в лейкоцитах и человека, и домового мыши большинство центромер находится в непосредственной близости к оболочке ядра, однако если кластеры теломер человека расположены в ядре относительно случайным образом, то у мыши их значительная часть находится недалеко от ядерной мембраны. Вероятно, это обусловлено практическим отсутствием у хромосом мыши коротких плеч. У бурозубок центромеры и теломеры также пространственно сближены как на митотических хромосомах, так и в интерфазных ядрах. Вероятно, это и является причиной «контакта» части теломерных кластеров с ядерной оболочкой у этих видов.

В заключение следует заметить, что, несмотря на существенные различия в локализации и числе ЯО-районов, а также в организации терминальных районов коротких плеч акроцентриков у двух видов-близнецов бурозубок

S. granarius и *S. araneus* (раса Cordon), трехмерная организация их интерфазных ядер оказалась достаточно схожей. По-видимому, механизмы, определяющие общий план трехмерной организации ядра, не лимитированы относительным расположением в хромосомах центромерных и теломерных районов. Более значимым может оказаться относительное положение в хромосомах теломерных и ЯО-районов. В связи с этим особый интерес представляют исследования видов с локализацией ЯО-районов внутри хромосомных плеч на достаточном удалении от ближайшей теломеры.

Мы выражаем нашу глубокую признательность В. Т. Волобуеву за первичные культуры фибробластов *S. araneus* и *S. granarius*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 05-04-48221 и 07-04-00513).

Список литературы

- Жарская О. О., Зацепина О. В. 2007. Динамика и механизмы реорганизации ядрышка в митозе. Цитология. 49 (5): 355—369.
- Жданова Н. С., Рубцов Н. Б., Минина Ю. М. 2007. Терминальные районы хромосом млекопитающих: пластичность и роль в эволюции. Генетика. 43: 721—732.
- Малыгин А. А., Грайфер Д. М., Зенкова М. А., Мамаев С. В., Карпова Г. Г. 1992. Аффинная модификация 80S рибосом из плаценты человека производными три- и гексауридилатов в качестве аналогов мРНК. Молекуляр. биол. 26: 369—377.
- Chen D., Huang S. 2001. Nucleolar components involved in ribosome biogenesis cycle between the nucleolus and nucleoplasm in interphase cells. J. Cell. Biol. 153: 169—176.
- Dobigny G., Ozouf-Costaz C., Bonillo C., Volobouev V. 2003. Evolution of rRNA clusters and telomeric repeats during explosive genome repatterning in *Taterillus X* (Rodentia, Gerbillinae). Cytogenet. Genome Res. 103: 94—103.
- Dundr M., Meier U. T., Lewis N., Rekosh D., Hammar-skjold M. L., Olson M. O. 1997. A class of nonribosomal nuclear components is located in chromosome periphery and in nucleolus-derived foci during anaphase and telophase. Chromosoma. 105: 407—417.
- Dundr M., Misteli T. 2001. Functional architecture in the cell nucleus. J. Biochem. 356: 297—310.
- Fajkus J., Sykorova E., Leitch A. R. 2005. Telomeres in evolution and evolution of telomeres. Chromosome Res. 13: 467—479.
- Ijdo J. W., Wells R. A., Baldini A., Reeders S. T. 1991. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)n generated by PCR. Nucl. Acids Res. 19: 4780.
- Johnson F. B., Marciniak R. A., Guarente L. 1998. Telomeres, the nucleolus and aging. Curr. Opin. Cell Biol. 10: 332—338.
- Kalitsis P., Griffiths B., Choo A. 2006. Mouse telocentric sequences reveal a high rate of homogenization and possible role in Robertsonian translocation. PNAS. 103: 8786—8791.
- Khurts S., Masutomi K., Delgermaa L., Arai K., Oishi N., Mizuno H., Hayashi N., Hahn W. C., Murakami S. 2004. Nucleolin interacts with telomerase. J. Biol. Chem. 279: 51 508—51 515.
- Liu W. S., Fredga K. 1999. Telomeric (TTAGGG)_n sequences are associated with nucleolus organizer regions (NORs) in the wood lemming. Chromosome Res. 7: 235—240.
- Martin R. M., Tunnemann G., Leonhardt H., Cardoso M. C. 2007. Nucleolar marker for living cells. Histochem. Cell Biol. 127: 243—251.
- Meyne J., Baker R. J., Hobart H. H., Hsu T. C., Ryder O. A., Ward O. G., Wiley J. E., Wurster-Hill D. H., Yates T. L., Moyzis R. K. 1990. Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequences in vertebrate chromosomes. Chromosoma. 99: 3—10.
- Mukharyamova K. S., Doudnik O. A., Speransky A. I., Zatssepina O. V. 1999. Double immunolocalization of major nucleolar proteins, fibrillarin and B23, in dividing mammalian cultured cells. Membr. Cell Biol. 12: 829—843.
- Narayanan A., Lukowiak A., Jady B. E., Dragon F., Kiss T., Terns R. M., Terns M. P. 1999. Nucleolar localization signals of box H/ACA small nucleolar RNAs. EMBO J. 18: 5120—5130.
- Negi S. S., Olson M. O. 2006. Effects of interphase and mitotic phosphorylation on the mobility and location of nucleolar protein B23. J. Cell Sci. 119: 3676—3685.
- Rubtsov N. B., Karamisheva T. V., Astakhova N. M., Liehr Th., Claussen U., Zhdanova N. S. 2000. Zoo-FISH with region specific paints for MVI5q. Cytogenet. Cell Genet. 90: 268—270.
- Solovei I., Cavallo A., Schermelleh L., Jaunin F., Scarsella C., Cmarko D., Cremer C., Fakan S., Cremer T. 2002. Spatial preservation of nuclear chromatin architecture during three-dimensional fluorescence *in situ* hybridization (3D-FISH). Exp. Cell Res. 276: 10—23.
- Taberlet P., Fumagalli L., Hausser J. 1994. Chromosomal versus mitochondrial DNA evolution: tracking the evolutionary history of the southwestern European populations of the *Sorex araneus* group (Mammalia, Insectivora). Evolution. 4: 623—636.
- Weierich C., Brero A., Stein S., von Hase J., Cremer C., Cremer T., Solovei I. 2003. Three-dimensional arrangements of centromeres and telomeres in nuclei of human and murine lymphocytes. Chromosome Res. 11: 485—502.
- Weipoltshammer K., Schöfer C., Almeder M., Philimonenko V. V., Frei K., Wachtler F., Hozak P. 1999. Intranuclear anchoring of repetitive DNA sequences: centromeres, telomeres, and ribosomal DNA. J. Cell Biol. 147: 1409—1418.
- Wojcik J. M., Borodin P. M., Fedya S., Fredga K., Hausser J., Mishta A., Orlov N. V., Searl J. B., Volobouev V. T. 2003. The list of the chromosome races of the common shrew *Sorex araneus* (updated 2002). Mammalia. 67: 169—178.
- Wong J. M., Kusdra L., Collins K. 2002. Subnuclear shuttling of human telomerase induced by transformation and DNA damage. Nat. Cell Biol. 4: 731—736.
- Ye J., Biltueva L., Huang L., Nie W., Wang J., Jing M., Su W., Vorobieva N. V., Jiang X., Graphodatsky A. S., Yang F. 2006. Cross-species chromosome painting unveils cytogenetic signatures for the Eulipotyphla and evidence for the polyphyly of Insectivora. Chromosome Res. 14: 14 151—14 159.
- Zhang S., Hemmerich P., Grosser F. 2004. Nucleolar localization of the human telomeric repeat binding factor 2 (TRF2). J. Cell Sci. 117: 3935—3945.
- Zhdanova N. S., Karamisheva T. V., Minina J., Astakhova N. M., Lansdorp P., Kammori M., Rubtsov N. B., Searle J. B. 2005. Unusual distribution pattern of telomeric repeats in the shrews *Sorex araneus* and *Sorex granarius*. Chromosome Res. 13: 617—625.
- Zhdanova N. S., Minina Y. M., Karamisheva T. V., Draskovic I., Rubtsov N. B., Londoño-Vallejo J. 2007a. The very long telomeres in *Sorex granarius* (Soricidae, Eulipotyphla) contain ribosomal DNA. Chromosome Res. (Accepted).
- Zhdanova N. S., Minina Y. M., Karamisheva T. V., Rubtsov N. B. 2007b. Pattern of telomeric and ribosomal DNA distribution in chromosomes of two related species, *Sorex araneus* and *Sorex granarius* (Soricidae, Eulipotyphla). Russian J. of Teriology. 6: 7—13.

3D ORGANIZATION OF INTERPHASE FIBROBLAST NUCLEI IN TWO CLOSELY RELATED SHREW SPECIES, *SOREX GRANARIUS* AND *S. ARANEUS*, DIFFERED BY THE STRUCTURE OF CHROMOSOME TERMINI

N. B. Rubtsov, T. V. Karamisheva, Yu. M. Minina, N. S. Zhdanova¹

Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of RAS, Novosibirsk; ¹ e-mail: zhdanova@bionet.nsc.ru

To study 3D organization of fibroblast interphase nuclei in two sibling shrew species, *Sorex araneus* from Cordon race and *S. granarius*, FISH with probe to telomeric and rDNA repeats, and immunofluorescence with ANA CREST and antibodies to nucleolus protein B23 were used. Karyotypes of studied species are composed of near identical chromosomal arms and differ by the number of metacentrics and the structure of terminal chromosome regions. The large telomeres containing on the average 218 kbp of telomere repeats characterize the short arms in all of 32 *S. granarius* acrocentrics. Telomere repeats in them alternate with nbosomal repeats. These regions also contain active NORs. In contrast, active NORs in *S. araneus* are localized at the terminal regions of 8 chromosomal arms (Zhdanova et al., 2005, 2007b). We have shown that telomere associations of chromosomes and contacts of a part of telomere clusters with inner nuclear membrane and nucleolus characterize interphase nuclei of both *S. granarius* and *S. araneus*. Moreover, the partial colocalization of telomere and ribosomal clusters, and spatial nearness of centomeric and telomeric regions were revealed in the interphase nuclei of *S. granarius*. Evidently, only those ribosomal clusters that contain a number of active ribosomal genes display connection with nucleolus. The stripping of nucleolus materials during transition of fibroblasts to mitosis and the role of B23 protein in this process has been studied.

Key words: 3D fibroblast organization, shrew, telomere, nucleolus, B23 protein, centromere.