

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ХРОМАТИНА СОМАТИЧЕСКОГО ЯДРА ИНFUЗОРИИ *DIDINIUM NASUTUM*

© Б. П. Караджян,¹ О. Г. Леонова,² В. И. Попенко²

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,

² Институт молекулярной биологии РАН, Москва;
электронный адрес: bpkarajan@mail.ru

Исследована организация хроматина макронуклеуса инфузорий *Didinium nasutum*, геном которого состоит из молекул ДНК субхромосомного размера. В интерфазе хроматин макронуклеуса организован в глыбки размером ~100—200 нм, часть из них объединена в короткие хрономемоподобные фибриллы переменной толщины. С помощью метода селективного окрашивания нуклеиновых кислот на поверхности большинства хроматиновых глыбок выявлены перихроматиновые фибриллы и гранулы. С помощью трехмерной реконструкции на основе серийных ультратонких срезов построены модели расположения хроматиновых глыбок в пространстве макронуклеуса и выявлены особенности их организации.

Ключевые слова: инфузории, макронуклеус, хроматин, перихроматиновые фибриллы, трехмерная реконструкция.

Didinium nasutum, как и другие инфузории, содержит два морфологически и функционально различных ядра: богатое ДНК соматическое ядро — макронуклеус, характеризующееся высокой транскрипционной активностью, и предположительно диплоидное генеративное ядро — микронуклеус, в котором вне периода полового процесса активность генов полностью (или почти полностью) репрессирована. В отличие от ядер высших эукариот макронуклеусы являются высокополиплоидными ядрами, их геном представлен набором относительно коротких по сравнению с высшими эукариотами молекул ДНК, размер которых составляет 5—20 т. п. н. для видов с короткими молекулами ДНК или несколько сотен т. п. н. для видов с субхромосомным размером ДНК. В то же время по биохимической организации хроматин макронуклеусов и ядер высших эукариот очень сходен (Raikov, 1995). Основная часть хроматина интерфазного макронуклеуса большинства изученных инфузорий организована в виде хроматиновых глыбок размером от 50 до 200 нм, и лишь небольшая часть хроматина находится в декомпактизованном состоянии. Считается, что хроматин, образующий глыбки, находится в транскрипционно-неактивном состоянии, т. е. часть генома макронуклеуса не участвует в транскрипции на протяжении всей интерфазы (Raikov, 1996). В этом отношении макронуклеусы инфузорий не отличаются от ядер других недифференцированных клеток, в которых доля транскрибируемой ДНК также незначительна.

В исследованиях, проведенных на выделенном хроматине (Мартынкина и др., 1984; Karajan et al., 1995) и на ультратонких срезах (Попенко и др., 1988; Иванова и др., 2002), было показано структурно-функциональное соответствие хроматиновых глыбок макронуклеусов инфузорий и хромомеров — дискретных структур хроматина в

ядрах высших эукариот, организованных по петельному принципу. В свою очередь хромомеры способны соединяться в структуры более высокого уровня организации — хрономемы, представляющие собой толстые тяжи толщиной 100—200 нм (Zatsepina et al., 1983; Ченцов, 1995). В данной работе мы обобщаем результаты исследования организации интерфазного хроматина макронуклеуса инфузории *D. nasutum*.

D. nasutum обладает относительно коротким клеточным циклом: генерационное время инфузории изученного клона равно 5 ч при культивировании инфузорий при 22 °С, причем G₁-период занимает 10 % генерационного времени, S-период — 80—85 %; период G₂ либо отсутствует, либо очень короткий (Караджян, 1987). Ранее при изучении организации хроматина интерфазного макронуклеуса *D. nasutum* с помощью метода дисперсии хроматина в растворе низкой ионной силы было показано, что структурная организация хроматина интерфазных макронуклеусов, находящихся на различных фазах клеточного цикла, в целом мало различается (Karajan et al., 1995).

Материал и методика

Инфузории *D. nasutum* культивировали на кипяченой водопроводной воде, в качестве корма использовали инфузорий *Paramecium caudatum*.

Электронная микроскопия. Для фиксации использовали 2%-ный раствор OsO₄ в 0.05 М какодилатном буфере (рН 7.2, 30 мин, лед) или свежеприготовленную смесь 1%-ного глутаральдегида и 1%-ного OsO₄ в 0.05 М фосфатном буфере (1 ч, лед, темнота), или 2.5%-ный раствор глутаральдегида в 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.5, 1 ч, 4 °С). После отмывания в 2—3 порциях соответствующей

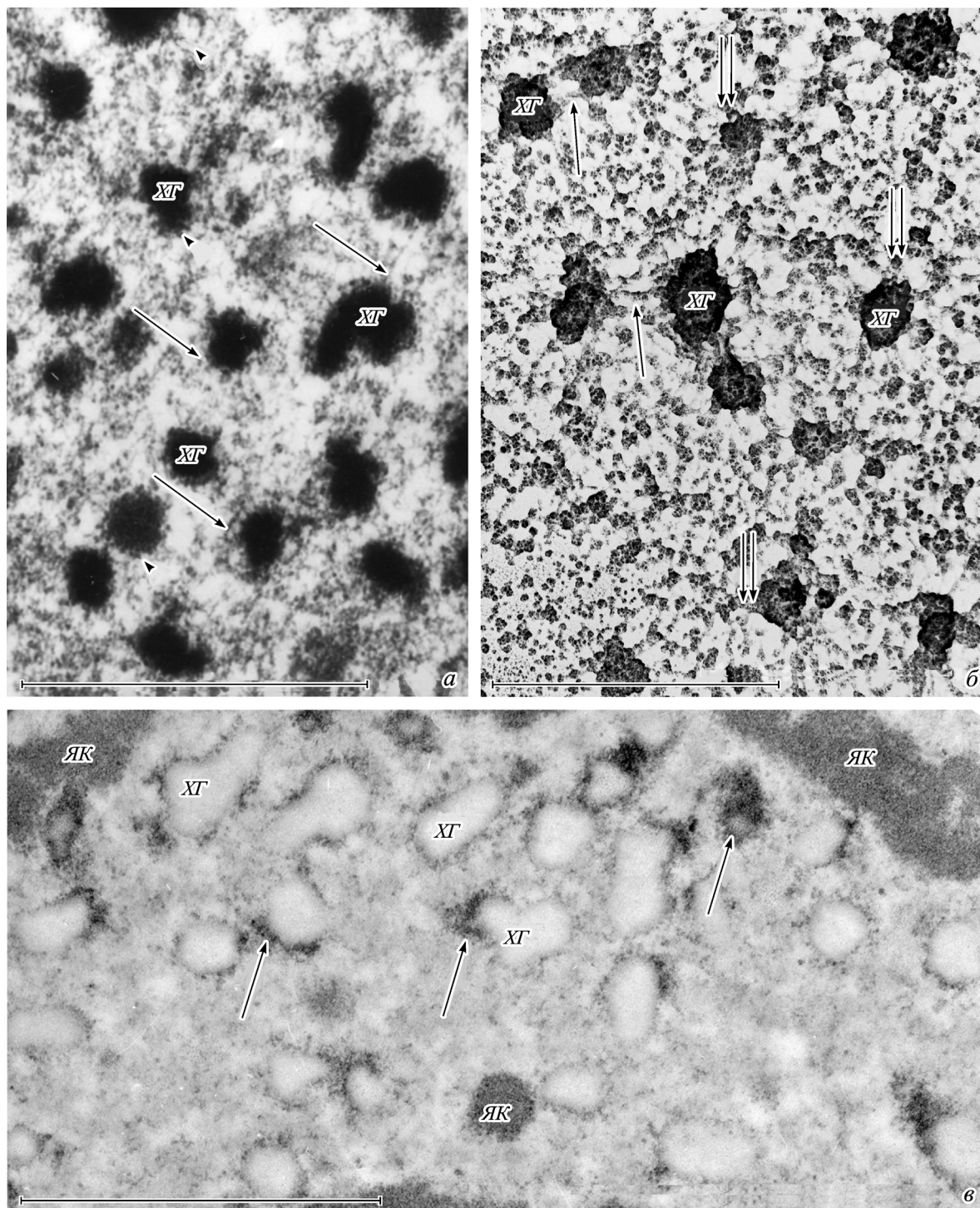


Рис. 1. Участок макронуклеуса с хроматиновыми глыбками (ХГ) инфузории *Didinium nasutum*.

а — ультратонкий срез; *стрелки* — перихроматиновые фибриллы, *головки стрелок* — перихроматиновые гранулы, *б* — хроматин макронуклеуса, диспергированный в течение 5 мин; видны одиночные хроматиновые глыбки (ХГ) и глыбки, соединенные друг с другом тяжами наднуклеосомной организации (*стрелки*); *двойные стрелки* — глобулярные структуры на поверхности хроматиновых глыбок. *в* — участок макронуклеуса после дифференциального контрастирования нуклеиновых кислот (Bernhard, 1969); вокруг отбеленных хроматиновых глыбок видна сохраняющая контраст перихроматиновая зона с РНК-содержащими структурами (*стрелки* — перихроматиновые глыбки). *ЯК* — ядрышки. *Масштабные отрезки* — 1 мкм.

ющего буфера инфузорий предзаключали в 2%-ный агар. Агаровые блоки дегидратировали в растворах этанола возрастающей концентрации и заключали в Эпон—Аралдит по стандартной методике.

Срезы получали на ультратоме LKB III. Окрашивание срезов уранил-ацетатом и цитратом свинца проводили по

стандартной методике. Для регрессивной окраски срезов (Bernhard, 1969) их помещали в 2%-ный водный раствор уранил-ацетата, затем промывали дистиллированной водой, обрабатывали 0.2 М раствором ЭДТА в течение 30 мин и после промывания дистиллированной водой окрашивали цитратом свинца в течение 15 мин.

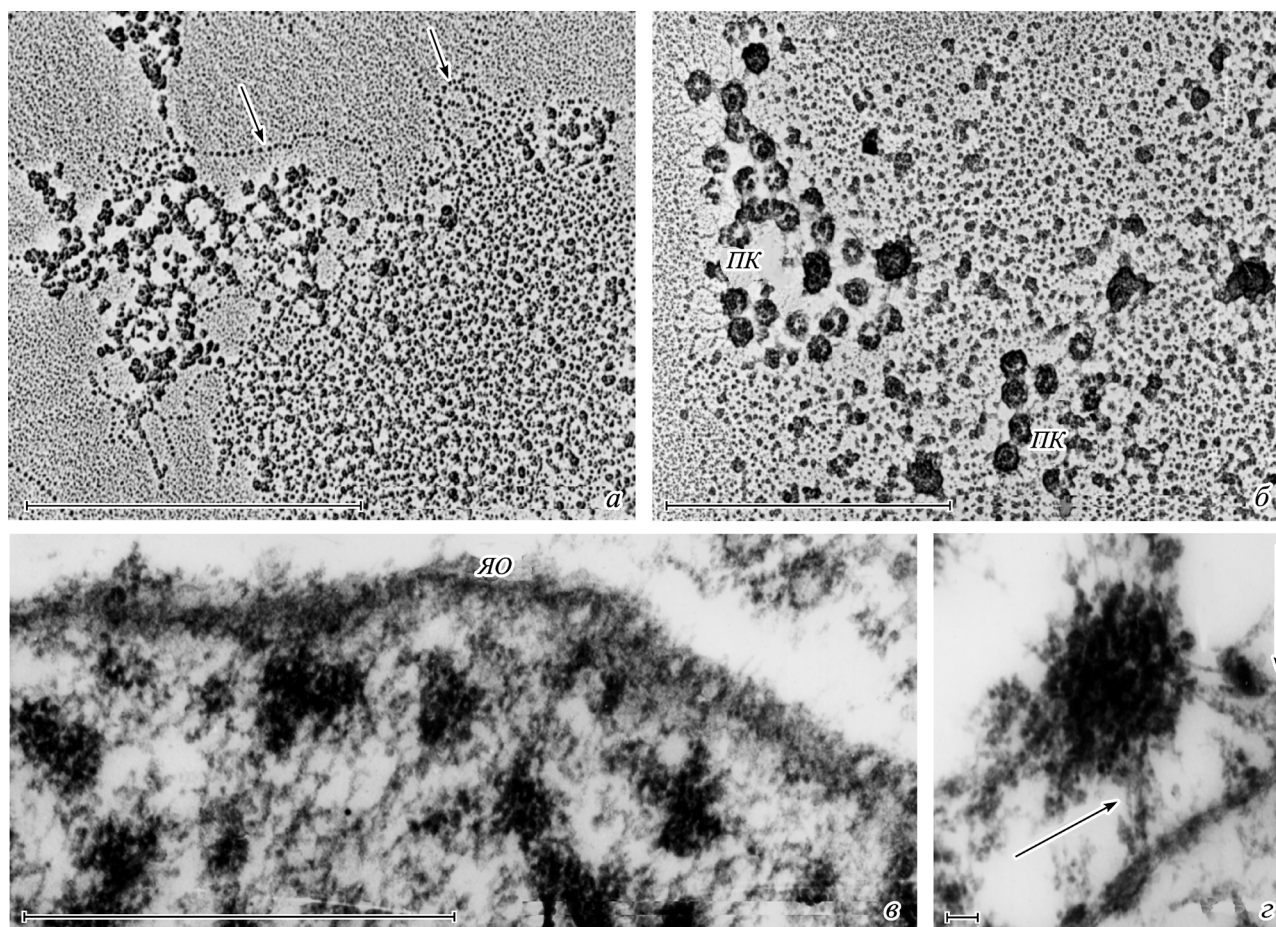


Рис. 2. Хроматин макронуклеуса *Didinium nasutum* после диспергирования в растворе с низкой ионной силой в течение 90 мин (а, б) и ультратонкие срезы периферических участков макронуклеуса (в, з).

а — гранулы (20—25 нм), перемежающиеся с хроматиновыми фибриллами (стрелки); б — связь хроматиновых фибрилл с порвыми комплексами (ПК) ядерной оболочки; в, з — хроматиновые глыбки в периферической зоне макронуклеуса. ЯО — ядерная оболочка, стрелки — хроматиновая глыбка, «заякоренная» на ядерной оболочке макронуклеуса пучками микрофиламентов. Масштабные отрезки — 0.5 (а), 1 (б, в) и 0.2 (з) мкм.

Препараты изучали в электронном микроскопе JEM-100СХ при 80 кВ. Размеры структур измеряли на сканированных фотографиях (конечное увеличение 33 200—50 000) и негативах (8300×—20 000×) с помощью компьютерной программы ImageJ.

Диспергирование хроматина в растворе низкой ионной силы проводили на выделенных макронуклеусах по методике, описанной ранее (Kagajan et al., 1995).

Трехмерную реконструкцию структур проводили на серийных ультратонких срезах (толщиной 50—70 нм, 15—25 шт.) с использованием компьютерной программы STEREM, которая позволяет проводить трассировку (векторизацию) контуров объектов, выравнивание смежных срезов относительно друг друга, создавать поверхности, моделирующие границы реконструируемых объектов, и проводить их морфометрический анализ (Леонова и др., 2003). Учитывали структуры хроматина размером более 50 нм. Объемы реконструированных участков макронуклеусов составляли от 5 до 20 мкм³.

Результаты

Хроматин интерфазного макронуклеуса *D. nasutum* на ультратонких срезах и на препаратах слабодиспергированного хроматина представлен множеством электрон-

но-плотных глыбок размером ~100—200 нм, более или менее равномерно заполняющих все пространство ядра. Часть глыбок располагается поодиночке, а часть объединяется в цепочки из двух-трех хроматиновых глыбок. Отдельные глыбки хроматина соединены друг с другом одним или несколькими тяжами наднуклеосомной организации. Поверхность хроматиновых глыбок неровная, в их составе почти всегда присутствует компонент, в котором различимы рыхло расположенные фибриллы диаметром 8—10 нм и глобулярные структуры диаметром 10—25 нм (рис. 1, а, б). Большая часть гранул имеет тесный контакт с перихроматиновыми фибриллами, незначительная часть их расположена изолированно от фибриллярного материала. Селективное контрастирование РНК-содержащих структур (Bernhard, 1969) показало, что после обработки срезов EDTA полный контраст сохраняет электронно-плотный фиброгранулярный материал, локализованный на внешней поверхности обесцвеченных хроматиновых глыбок (рис. 1, в). Этот материал, по-видимому, соответствует перихроматиновым фибриллам и гранулам, которые были впервые идентифицированы в ядрах соматических клеток млекопитающих с помощью метода дифференциального контрастирования нуклеиновых кислот (Moneron, Bernhard, 1969). Гомогенные скопления гранул диаметром около 20 нм, которые перемежаются со скоплениями нуклеосомных фибрилл хроматина, обнаружива-

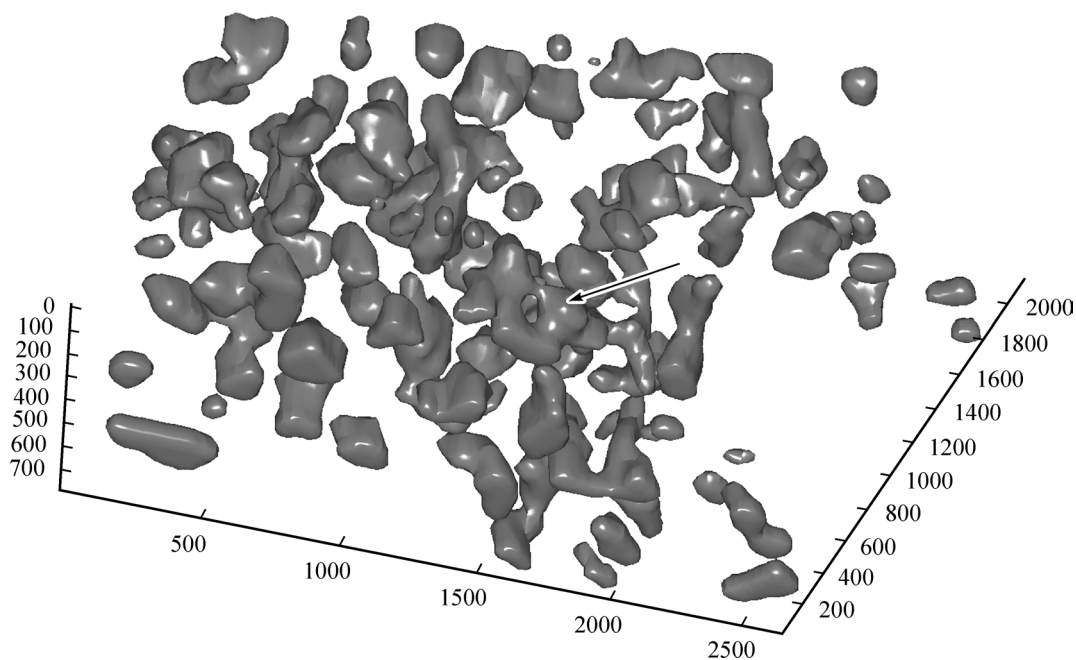


Рис. 3. Трехмерная модель хроматина в интерфазном макронуклеусе инфузории *Didinium nasutum*.

Стрелка указывает на кольцевую фибриллу в форме «бублика».

ются и на препаратах диспергированного интерфазного хроматина (рис. 2, а).

На ультратонких срезах видно, что часть хроматиновых глыбок располагается в непосредственной близости от внутренней мембраны ядерной оболочки макронуклеуса (рис. 2, в). Ядерная оболочка имеет типичное двухмембранное строение и снабжена довольно частыми порами — средняя концентрация пор в интерфазном макронуклеусе *D. nasutum* составляет ~100 шт./мкм². Поры расположены по поверхности макронуклеуса более или менее равномерно, хотя встречаются небольшие участки ядерной оболочки, лишённые ядерных пор. На срезах видно, что хроматиновые глыбки «заякорены» на внутренней мембране ядерной оболочки или соединены с ней сетью филаментов размером ~10 нм (рис. 2, г). Более отчетливо связь хроматина с элементами ядерной оболочки обнаружена на препаратах диспергированного хроматина — на выделенном хроматине интерфазного хроматина, приготовленного по методу Миллера, видна непосредственная связь нуклеосомных фибрилл хроматина и поровых комплексов ядерной оболочки; в поровых комплексах отчетливо видны центральные гранулы диаметром около 25 нм (рис. 2, б). На этих же препаратах по периферии агрегатов диспергированного хроматина видны длинные петли, образованные нуклеосомными фибриллами хроматина. Точно определить длину нуклеосомных фибрилл было невозможно, так как ни на одном из изученных препаратов мы не смогли обнаружить нуклеосомные фибриллы с обоими свободными концами. Тем не менее вид препаратов диспергированного хроматина позволяет сделать вывод о том, что макронуклеус *D. nasutum* представлен молекулами субхромосомного размера.

На рис. 3 представлены трехмерные реконструкции хроматина фрагмента интерфазного макронуклеуса *D. nasutum*. На моделях реконструированного хроматина видно, что в одних и тех же участках ядра часть глыбок располагается поодиночке, а часть объединяется в короткие фибриллы, толщина которых (100—200 нм) соответству-

ет толщине хромонем в ядрах высших эукариот. Доля хроматиновых телец, объединенных в цепочки из двух-трех хроматиновых телец, значительно выше, чем это можно видеть на двухмерных срезах. Обычно хроматиновые глыбки соединяются в фибриллы линейно, однако встречаются и структуры в форме «бублика», а также «плоские» участки, образованные из нескольких глыбок хроматина (рис. 3). Длина хроматиновых фибрилл в макронуклеусе *D. nasutum*, определенная линейными измерениями на полученных моделях или как частное от деления объема фибриллы на среднюю площадь ее поперечного сечения, составила 450—700 нм.

Обсуждение

Хроматин макронуклеуса *D. nasutum*, как у многих видов инфузорий (Raikov, 1995), в интерфазе упакован в компактные хроматиновые глыбки размером ~100 нм. На трехмерных моделях видно, что в интерфазных макронуклеусах *D. nasutum* значительная часть хроматиновых глыбок соединена в короткие фибриллы. На основе исследований, проведенных на выделенном хроматине и на ультратонких срезах инфузорий (Мартынкина и др., 1984; Karajan et al., 1995; Popenko et al., 1998; Иванова и др., 2002), было высказано предположение о структурно-функциональном соответствии хроматиновых глыбок макронуклеусов инфузорий и хромонемов — дискретных структур хроматина в ядрах высших эукариот, организованных по петельному принципу (Zatsepina et al., 1983; Ченцов, 1995). Это предположение получило в дальнейшем подтверждение в результате исследований (Попенко и др., 2005), показавших способность хроматиновых глыбок интерфазных макронуклеусов *D. nasutum* компактизоваться после обработки ионами Mg²⁺ в толстые протяженные тяжи, подобные хромонемам, описанным в ядрах растений и хромосомах животных.

Использование метода дифференциального контрастирования нуклеиновых кислот позволило нам обнаружить продукты транскрипции в виде типичных перихроматинных фибрилл и гранул на поверхности большинства хроматинных глыбок *D. nasutum*. Перихроматинные фибриллы и гранулы были впервые идентифицированы в ядрах соматических клеток млекопитающих (Watson, 1962; Moneron, Bernhard, 1969), затем в разных объектах животного и растительного происхождения (см. обзоры: Spector et al., 1993; Fakan, 1994; Smarco et al., 1999). Было показано, что перихроматинные фибриллы быстро включают предшественники синтеза РНК — меченый уридин и бромуридинфосфат — и чувствительны к действию ингибиторов транскрипции. В совокупности эти работы привели к общепринятому в настоящее время представлению о том, что перихроматинные фибриллы являются первичными транскриптами пре-мРНК. Предположение о том, что перихроматинные фибриллы могут быть морфологическим выражением вновь синтезированных транскриптов гетерогенной ядерной РНК, было высказано еще в 1970-е годы (Bernhard, 1977; Smetana, 1977). Считается, что наличие в ядре значительного количества перихроматинных фибрилл свидетельствует о транскрипционной активности ядра (Smarco et al., 1999).

Перихроматинные фибриллы в макронуклеусе *D. nasutum* несколько толще (около 10 нм), чем типичные перихроматинные фибриллы, но их локализация по периферии хроматинных глыбок абсолютно типична. Перихроматинные фибриллы и гранулы вокруг хроматинных глыбок интерфазного макронуклеуса *D. nasutum* соответствуют, по-видимому, РНП-структурам на участках транскрипционно-активного хроматина. Это предположение хорошо согласуется с имеющимися данными о том, что транскрипция в макронуклеусе инфузорий происходит подобно транскрипции клеток многоклеточных организмов — на петлях хроматина, отходящих от частично декомпактизованных хроматинных глыбок (Тихоненко и др., 1984). Большое количество перихроматинных фибрилл и гранул в макронуклеусе *D. nasutum*, по-видимому, свидетельствует о том, что в интерфазном макронуклеусе этой инфузории значительная часть хроматинных глыбок находится в транскрипционно-активном состоянии.

В интерфазном макронуклеусе *D. nasutum* часть хроматинных глыбок располагается в непосредственной близости от ядерной оболочки — хроматинные глыбки «заякорены» на внутренней мембране ядерной оболочки или соединены с ней сетью филаментов размером 10 нм. Работы последних лет показали участие ядерной оболочки в организации хроматина, однако механизм этих взаимодействий остается во многом неизученным (см. обзор: Губанова, Киселева, 2007). Являясь важным структурным элементом клеточного ядра, ядерная оболочка не только выполняет функцию физического барьера, но и обеспечивает избирательное регулирование транспорта веществ между ядром и цитоплазмой благодаря наличию в ней поровых комплексов, а также участвует в процессах репликации и транскрипции. Внутренняя мембрана ядерной оболочки тесно связана с ядерной ламиной, на которой «заякориваются» фибриллы хроматина (см. обзоры: Goldman et al., 2002; Gruenbaum et al., 2003).

Цитологические исследования показывают, что в среднем количество ядерных пор на единицу площади оболочки хорошо коррелирует с метаболической активностью клеток и может использоваться в качестве критерия при оценке интенсивности синтетических процессов

в ядре. В интерфазном макронуклеусе *D. nasutum* средняя концентрация пор довольно велика, в то же время по поверхности ядра поры расположены неравномерно. Известно, что в ядрах млекопитающих число пор уменьшается в районах расположения гетерохроматина, поэтому можно было ожидать, что число пор в макронуклеусе *D. nasutum* будет уменьшаться вблизи участков скопления компактных хроматинных глыбок. Однако, как показывают данные трехмерной реконструкции участков макронуклеуса в цистах покоя (Леонова и др., 2005), включающие в себя ядерную оболочку и прилегающее к ней пространство макронуклеуса, очевидной корреляции между числом пор и расположением хроматинных глыбок в макронуклеусе *D. nasutum* не наблюдается. Возможно, это связано с особенностями организации хроматина макронуклеуса инфузорий.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-01731а).

Список литературы

- Губанова Н. В., Киселева Е. В. 2007. Структурная организация и функция ядерной оболочки. Цитология. 49 (4) : 257—269.
- Иванова Ю. Л., Леонова О. Г., Шутик М. А., Попенко В. И. 2002. Формирование хромонемоподобных фибрилл в соматических ядрах инфузорий под действием ионов магния. Молекуляр. Биол. 36 (5) : 842—848.
- Караджян Б. П. 1987. Репликация рДНК в клеточном цикле инфузории *Didinium nasutum*. Докл. РАН. 296 (4) : 984—987.
- Леонова О. Л., Иванова Ю. Л., Ивлев Ю. Ф., Попенко В. И. 2003. Трехмерная реконструкция структуры хроматина в соматическом ядре инфузории *Bursaria truncatella*. Докл. РАН. 391 (3) : 403—406.
- Леонова О. Л., Караджян Б. П., Ивлев Ю. Ф., Иванова Ю. Л., Попенко В. И. 2005. Ядерная оболочка, хроматин и ядрышки: исследование пространственных отношений в макронуклеусе *Didinium nasutum* с помощью стереорекострукции. Биол. мембраны. 22 (3) : 265—272.
- Мартынкина Л. П., Венгеров Ю. Ю., Беспалова И. А., Сергеева Г. И., Тихоненко А. С. 1984. Структура интерфазного хроматина макронуклеуса инфузории *Bursaria truncatella*. Молекуляр. биол. 18 (2) : 272—276.
- Попенко В. И., Леонова О. Л., Иванова Ю. Л., Караджян Б. П., Ивлев Ю. Ф. 2005. Пространственная организация хромонемоподобных структур в соматических ядрах инфузорий. Биол. мембраны. 22 (3) : 258—264.
- Попенко В. И., Яковлева М. Г., Мартынкина Л. П., Резник М. В., Москвин-Тарханов М. И., Тихоненко А. С. 1988. Структурная организация хроматина и ультраструктура макронуклеуса в процессе деления инфузории *Bursaria truncatella*. Молекуляр. биол. 22 (6) : 1678—1687.
- Тихоненко А. С., Беспалова И. А., Мартынкина Л. П., Попенко В. И., Сергеева Г. И. 1984. Структура хроматина макронуклеуса инфузории *Bursaria truncatella*. III. Структурная организация хроматина в цистах покоя и в процессе эксцистирования. Молекуляр. биол. 18 (4) : 1060—1065.
- Ченцов Ю. С. 1995. Общая цитология. М.: МГУ. 384 с.
- Bernhard W. 1969. A new staining procedure for electron microscopical cytology. J. Ultrastruct. Res. 27 : 250—265.
- Bernhard W. 1977. Differentiation of the cell nucleus. In: Cell differentiation in microorganisms, plants and animals. Leipzig: Deutsch. Acad. Naturwiss. 00 : 579—597.
- Smarco D., Verschure P. J., Martin T. E., Dahmus M. E., Krause S., Fu X.-D., van Driel R., Fakan S. 1999. Ultrastructural analysis of transcription and splicing in the cell nucleus after bromo-UTP microinjection. Mol. Biol. Cell. 211—223.

Fakan S. 1994. Perichromatin fibrils are *in situ* forms of nascent transcripts. Trends Cell Biol. 4 : 86—90.

Goldman R. D., Gruenbaum Y., Moir R. D., Shumaker D. K., Spann T. P. 2002. Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. Genes Develop. 16 : 533—547.

Gruenbaum Y., Goldman R. D., Meyuhas R., Mills E., Margolite A., Fridkin A., Dayani Y., Prokocimer M., Enosh A. 2003. The nuclear lamina and its functions in the nucleus. Int. Rev. Cytol. 26 : 1—62.

Karajan B. P., Popenko V. I., Raikov I. B. 1995. Organization of transcriptionally inactive chromatin of interphase macronucleus of the ciliate *Didinium nasutum*. Acta protozool. 34 : 135—141.

Moneron A., Bernhard W. 1969. Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. J. Ultrastruct. Res. 27 : 266—288.

Popenko V. I., Cherny N. E., Ivanova J. L., Yakovleva M. G. 1998. Ultrastructure of the macronucleus in the resting cysts of the ciliate *Bursaria truncatella*. Eur. J. Protistol. 34 : 18—28.

Raikov I. B. 1995. Structure and genetic organization of the polyploid macronucleus of ciliates: a comparative review. Acta protozool. 34 : 151—171.

Raikov I. B. 1996. Nuclei of Ciliates. In: Ciliates: cells as organism. Stuttgart; Jena; New York: Gustav Fischer Verlag. 221—242.

Smetana K. 1977. Further cytochemical studies on the perichromatin region of the nucleus. Biol. Cellulaire. 30 : 207—210.

Spector D. L., O'Keefe R. T., Jimenez-Garcia L. F. 1993. Dynamics of transcription and pre-mRNA splicing within the mammalian cell nucleus. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 58 : 799—805.

Watson M. L. 1962. Observation on a granule associated with chromatin in the nuclei in the cells of rat and mouse. J. Cell Biol. 13 : 160—167.

Zatsepina O. V., Polyakov V. Yu., Chentsov Yu. S. 1983. Chromonema and chromomeres: structural units of mitotic and interphase chromosomes. Chromosoma. 88 : 91—97.

Поступила 10 VIII 2009

CHARACTERISTICS OF CHROMATIN STRUCTURAL ORGANIZATION IN SOMATIC NUCLEUS OF THE CILIATE *DIDINIUM NASUTUM*

B. P. Karajan,¹ O. G. Leonova,² V. I. Popenko²

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg,
and ² Institute of Molecular Biology RAS, Moscow;
e-mail: bpkarajan@mail.ru

Structural organization of macronuclear chromatin of the ciliate *Didinium nasutum* was studied. Macronuclear genome of *D. nasutum* is represented by DNA molecules of subchromosomal size. At interphase, macronuclear chromatin is organized into chromatin clumps ~100—200 nm in size and some of them form short thick fibres consisting of several chromatin clumps. Using differential staining of nucleic acids on ultrathin sections we revealed perichromatin fibres and granules on the surface of many chromatin clumps. 3D models of spatial distribution of chromatin clumps in the macronucleus were reconstructed on the basis of serial ultrathin sections and peculiar features of their organization were studied.

Key words: ciliates, macronucleus, chromatin, perichromatin fibrils, 3D reconstruction.