

## ФИБРИЛЛЯРНЫЙ АКТИН В ЯДЕРНОМ АППАРАТЕ ИНФУЗОРИИ *PARAMECIUM CAUDATUM*

© К. А. Бенкен, Е. В. Сабанеева<sup>1</sup>

*Кафедра цитологии и гистологии С.-Петербургского государственного университета;*  
<sup>1</sup> электронный адрес: *saban@mail333.com*

Благодаря гетероморфизму ядер инфузории представляют собой удобную модель для изучения роли актина в пространственной организации и транскрипционной активности ядра. Актин в ядерном аппарате инфузории *Paramecium caudatum* был исследован с помощью флуоресцентно меченного фаллоидина и непрямой иммуноцитохимии. Установлено присутствие фибрillлярной формы актина в обоих ядрах. Актин выявляется в зонах локализации хроматина и часто ассоциирован с периферий амплифицированных ядрышек в макронуклеусе. Показано изменение распределения актина в зависимости от различного физиологического состояния клеток. Стабильное заражение внутриядерными эндобионтами макронуклеуса *Holospora obtusa* приводит к потере ядерного актина, снижению механической прочности ядра и перераспределению фосфорилированной формы связывающего актин белка кофилина. В развивающихся зачатках макронуклеусов у эксконьюгантов обнаружено сферическое тельце, напоминающее кариосферу.

**Ключевые слова:** ядерный актин, инфузории, гетероморфизм ядер, макронуклеус, амплифицированные ядрышки, кофилин, внутриядерные эндобионты.

**Принятые сокращения:** ф-кофилин — фосфорилированный кофилин.

Актиновый цитоскелет является важнейшим структурным элементом клетки, присущим всем эукариотическим организмам. В цитоплазме клеток млекопитающих выявлены 3 изоформы актина  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ , многочисленные функции которых хорошо изучены: мышечное сокращение, поддержание формы клетки и участие в ее делении, транспорт органелл, участие в процессах эндо- и экзоцитоза (Khaitlina, 2001). Долгое время исследования были сосредоточены исключительно на цитоплазматической форме актина, тогда как данные о наличии актина в ядре воспринимались как артефакт, несмотря на то что отдельные сообщения о ядерной локализации актина регулярно встречаются с середины 1980-х годов (Egly et al., 1984; Scheer et al., 1984). Однако в настоящее время существование ядерной формы актина не подвергается сомнению, причем установлено, что в ядре актин представлен  $\beta$ -формой (Pederson, Aebi, 2005; Percipalle, Visa, 2006; Pederson, 2008). Использование специфичных антител к определенным участкам молекулы актина позволило выявить различные, в том числе нетрадиционные, конформации ядерного актина (Gonsior, 1999; Schoenenberger et al., 2005; Jockusch et al., 2006).

В последнее время появляется все больше публикаций, свидетельствующих о том, что актин в ядре существует не только в виде мономеров (Боголюбова, Боголюбова, 2009), но и в олиго- и полимерной формах (Pederson, Aebi, 2005; Percipalle, Visa, 2006; Vartiainen, 2007; Pederson, 2008). В силу своих размеров (42 кДа) мономерный актин, не имеющий сигнала ядерной локализации, может проникать в ядро путем диффузии через ядерные поровые

комpleksы. Наличие у актина двух сигнальных последовательностей экспорта, с которыми связываются экспортины, препятствует его накоплению в ядре (Wada et al., 1998). Интересно, что в гигантских ядрах ооцитов ксенопуса, у которых отсутствует экспрессия экспортин-6, концентрация актина в ядре значительно выше, чем в ядрах соматических клеток млекопитающих, причем актин в ядрах ооцитов ксенопуса присутствует в виде фибрилл (Morozova, Kiseleva, 2008). Инъекция экспортин-6 приводит к снижению концентрации актина и как следствие — к снижению механической прочности ядра ооцита (Bohnsack et al., 2006). По-видимому, степень полимеризации актина в ядре, так же как и в цитоплазме, зависит от его концентрации и активности ряда связывающих актин белков. Присутствие последних в ядре было показано неоднократно (Nowak et al., 1997; Gettemans et al., 2005; Dingová et al., 2009).

Представления о функциях актина в ядре также претерпели существенные изменения. Первоначально предполагалось, что этот белок является компонентом ядерного матрикса и выполняет исключительно структурную функцию, однако к настоящему времени перечень функций ядерного актина существенно расширился. Мономерный актин участвует в модулировании структуры хроматина (Zhao et al., 1998), а в виде олигомера формирует транскрипционные комплексы со всеми тремя РНК-полимеразами — РНК-полимеразой I (Philimonenko et al., 2004; Kisela et al., 2005), РНК-полимеразой II (Kukalev et al., 2005) и РНК-полимеразой III (Hu et al., 2004).

Изучение ядерного актина у протистов может представлять особый интерес. Несмотря на существование общих принципов организации ядра у многоклеточных и низших эукариот, для ядерного аппарата многих протистов характерны особенности, касающиеся как архитектуры ядра, так и молекулярной организации генома. К числу наиболее ярких примеров относятся отсутствие ламины в ядре протистов, ненуклеосомная упаковка хроматина в хромосомах динофлагеллят, наличие мини-хромосом и инвертированное по сравнению с ядрышками многоклеточных расположение компонентов ядрышка в макронуклеусах инфузорий (Райков, 1978; Raijkov, 1982; Postberg et al., 2006). Есть основания полагать, что высокая прочность крупных овулярных ядер амеб и амплилоидных макронуклеусов инфузорий, синхронность преобразований их экстрахромосомного ядрышкового аппарата, корректная сегрегация геномов при делении макронуклеусов и ряд других феноменов могут быть связаны в первую очередь с особенностями организации ядерного матрикса протистов. Претендентом на роль основного структурного белка ядра протистов в отсутствие ламины мог бы быть актин, однако исследования ядерного актина у протистов носят фрагментарный характер и преимущественно базируются на данных электронной микроскопии (Hauser, 1973; Fukui, 1978; Méténier, 1984; Pomorsky, Grebecka, 1995; Soyer-Gobillard et al., 1996).

Благодаря наличию у инфузорий ядерного дуализма, т. е. одновременного присутствия в цитоплазме транскрипционно активного макронуклеуса и неактивного микронуклеуса, эти протисты представляют собой удобную модель для изучения ядерного актина и его роли в пространственной организации и транскрипционной активности ядра. Вместе с тем имеются значительные различия в аминокислотной последовательности актина парамеций по сравнению с актином млекопитающих, из-за которых его иногда называют «нетрадиционным» (Villalobo et al., 2001). Так, сайт актина, ответственный за полимеризацию, содержит многочисленные отличия от традиционного, поэтому в клетках не образуется длинных фибрилл, и вся система микрофиламентов является крайне лабильной. Последнее обстоятельство накладывает особые требования к условиям фиксации клеток. Кроме того, огромное разнообразие изоформ актина и родственных ему белков у инфузорий рода *Paramecium* (Sehring et al., 2007) существенно осложняет исследования с использованием коммерчески доступных антител, поэтому вопрос о существовании актина в ядерном аппарате парамеций долгое время оставался открытым. Достоверные данные о наличии актина в макронуклеусе парамеций были получены лишь совсем недавно (Sehring et al., 2010), причем было показано, что подавление экспрессии гена, кодирующего изоформу актина 4-1, с использованием соответствующей интерферирующей РНК приводит к блокированию деления макронуклеуса и самой клетки. Этот факт свидетельствует о важной роли актина в функционировании ядерного аппарата инфузорий, что и определяет необходимость дальнейших исследований в этом направлении. Следует отметить, что связывающие актин белки, осуществляющие регуляцию динамики фибриллярной и глобулярной форм актина, у инфузорий практически не изучены, поэтому данный аспект работы может представлять особый интерес.

Целью данной работы было изучение распределения актина в ядерном аппарате инфузории *P. caudatum* при

различном физиологическом состоянии клеток с помощью флуоресцентного фаллоидина и метода непрямой иммуноцитохимии с использованием двух видов антител (коммерческих моноклональных антител к актину млекопитающих и поликлональных антител к изоформе актина 1-1 *P. aurelia*). Поскольку связывающий актин белок кофилин способствует разборке филаментов актина, одной из задач работы было изучение распределения активной и инактивированной форм кофилина в клетках, зараженных внутриядерными эндобионтами и свободных от них.

## Материал и методика

**Клеточные линии.** В работе были использованы клоны *P. caudatum* П 03-6, ЕО 03-3 и ПШ 03-3, выделенные из природных популяций Ленинградской обл. в 2003 г., и клон 03 274-2, зараженный эндобионтами макронуклеуса *Holospora obtusa*, любезно предоставленный сотрудниками Лаборатории кариологии одноклеточных М. С. Раутиан и И. И. Скобло. Клоны культивировали по модифицированной методике Соннеборна (Sonneborn, 1970) при комнатной температуре. Питательный средой служил салатный отвар, зараженный бактериями *Enterobacter aerogenes*.

**Электрофорез и Вестерн-блотинг.** Клетки осаждали центрифугированием и отмывали в дистиллированной воде. Для выделения тотального белка клетки гомогенизировали путем многократного пропускания через шприц с иглой 0.6 мм в присутствии ДНКазы I или без нее. Затем к гомогенату добавляли буфер для проб по Лэммли и 7%-ный меркаптоэтанол. В некоторых опытах выделение белка проводили с добавлением ингибиторов протеаз PMSF. Пробы кипятили 5—7 мин и осаждали фрагменты клеток центрифугированием при 7000 об/мин. Электрофоретическое разделение белков проводили в 12%-ном полиакриламидном геле (Laemmli, 1970). Для определения молекулярной массы использовали белок миофибриллы мидии, обработанный аналогичным способом, и маркер для белков малой молекулярной массы (Хеликон, Россия).

Методом полусухого переноса белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Sigma-Aldrich, США). Блокирование мест неспецифического связывания проводили 3%-ным обезжиренным молоком на 0.01 М PBS в течение ночи при 4 °C, затем мембрану инкубировали в течение 1 ч с первичными антителами, а затем в течение 1 ч со вторичными антителами, конъюгированными со щелочной фосфатазой. В качестве первичных антител в работе были использованы поликлональные кроличьи антитела против актина 1-1 *P. aurelia*, моноклональные мышиные антитела против актина ACTN05 (C4), козы поликлональные антитела против С-конца кофилина человека и кроличьи поликлональные антитела против фосфорилированного кофилина (Santa Cruz Biotechnology, США). В качестве вторичных антител использовали козы антитела против кроличьего иммуноглобулина G, конъюгированные со щелочной фосфатазой (Sigma, США), ослиные антитела против козьего иммуноглобулина G, конъюгированные с биотином (Santa Cruz Biotechnology, США), а также козы антитела против мышного иммуноглобулина G, конъюгированные со щелочной фосфатазой (Sigma, США). В работе использовали следующие разведения антител: антитела к актину 1-1 и к актину млекопитающих — 1 : 1000, антитела к кофилину — 1 : 600, антитела

к фосфорилированному кофилину — 1 : 600. Вторичные антитела использовали обычно в разведении 1 : 20 000.

После инкубаций с антителами мембрану промывали буфером PBS с 0.05 % Tween-20 3 раза по 5—7 мин. Для окрашивания мембрану отмывали в буфере для щелочной фосфатазы и добавляли субстраты щелочной фосфатазы NBT и BCIP согласно рекомендациям фирмы-производителя (Sigma, США). Реакцию останавливали промыванием мембранны в дистиллированной воде.

**Приготовление тотальных препаратов.** Для приготовления тотальных препаратов клетки помещали на предметные стекла, предварительно покрытые поли-L-лизином (Menzel GmbH, Германия), и префиксировали в 50%-ном метаноле, разведенном на PBS (рН 7.2), содержащем 2 mM EGTA, в течение 20 с. Затем избыток жидкости удаляли с помощью тонко оттянутой пипетки и фиксировали клетки 100 % метанолом при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 3—7 мин. После фиксации препараты переносили в PBS, а затем клетки пермеабилизировали 0.5%-ным раствором Тритона X-100 на PBS в течение 30 мин. В ряде экспериментов клетки фиксировали 4%-ным параформальдегидом на PBS.

**Выделение макронуклеусов.** Макронуклеусы изолировали из клеток в растворе 0.3 M NaCl, содержавшем 0.25 % Тритона X-100. Выделившиеся из клеток ядра собирали тонко оттянутой стеклянной пипеткой и помещали либо непосредственно в 4%-ный параформальдегид на PBS, либо предварительно отмывали PBS. Длительность фиксации составляла 30 мин. В некоторых экспериментах выделенные ядра оставляли без фиксации.

**Приготовление парафиновых срезов.** Клетки фиксировали 4%-ным параформальдегидом и заливали в 3%-ную агарозу. Подготовку материала осуществляли по стандартной методике для гистологических срезов. Полученные парафиновые блоки резали с помощью микротома Leica SM2000R (Германия).

**Иммуноцитохимия.** На препаратах клеток и выделенных ядер сайты неспецифического связывания блокировали в 3%-ном BSA на PBS в течение 30 мин, затем инкубировали с первичными антителами во влажной камере в течение либо 1.5 ч при комнатной температуре, либо ночи при  $4^{\circ}\text{C}$ . Далее препараты отмывали 2 раза по 10 мин PBS, после чего инкубировали в 3%-ном BSA на PBS, содержащем 0.1 % Tween-20 (30 мин). Инкубацию со вторичными антителами проводили в течение 1 ч. После отмывок в PBS препараты заключали в среду, содержащую 60%-ный глицерин и PPDI или DABCO, предотвращающие выгорание флуорохрома. В части экспериментов в среду добавляли DAPI.

Для иммуноцитохимии использовали следующие разведения первичных антител: антитела к актину 1-1 и к актину млекопитающих — 1 : 50; антитела к кофилину — 1 : 50; антитела к фосфорилированному кофилину — 1 : 100. В качестве вторичных антител применяли козы антитела против крольчего иммуноглобулина G, коньюгированные с флуорохромами Су3 или FITC (Sigma, США), и ослиные антитела против козьего иммуноглобулина G, коньюгированные с FITC (Santa Cruz Biotechnology, США), а также козы антитела против мышного иммуноглобулина G (Sigma, США). Вторичные антитела использовались обычно в разведении 1 : 200. В качестве контроля служили препараты, обработанные только вторичными антителами.

**Обработка ТРИТЦ-фаллоидином.** Для выявления актина использовали фаллоидин, коньюгирован-

ный с флуорохромом ТРИТЦ (Sigma, США). Чтобы избежать реорганизации актинового цитоскелета, использовали метод пермеабилизации клеток глицерином (Van Gestel et al., 2001) и низкие концентрации ТРИТЦ-фаллоидина, так как применение высоких концентраций (более 20 мкг/мл), согласно некоторым данным (Kersken et al., 1986), приводит к искусственному перераспределению актина.

Клетки помещали в раствор 2%-ного глицерина и ТРИТЦ-фаллоидина с конечной концентрацией 1 мкг/мл на салатном отваре, буфере РНЕМ или на 0.02 M PBS на время от 35 до 90 мин.

Выделенные макронуклеусы также обрабатывали ТРИТЦ-фаллоидином в конечной концентрации 1 мкг/мл на 0.02%-ном PBS в течение 10—30 мин. В некоторых экспериментах препараты докрашивали DAPI.

Парафиновые срезы обрабатывали ТРИТЦ-фаллоидином, отмывали в PBS и заключали в глицерин с добавлением DAPI. Контрольные препараты перед окрашиванием обрабатывали протеиназой K (0.05 мг/мл).

Препараты анализировали с использованием микроскопа Leica DM6000 B, оборудованного цифровой камерой Leica DFC500, и конфокального лазерного сканирующего микроскопа Leica TCS SPE2 (Германия). Полученные изображения анализировали с помощью программы ImageJ.

## Результаты

**Электрофоретическое разделение белков и Вестерн-блотинг.** При обработке антителами к актину 1-1 *P. aurelia* блотов, полученных после электрофоретического разделения тотального белка *P. caudatum*, выделенного с помощью стандартного метода, выявлялись полосы, соответствующие белкам с мол. массами около 66, 42, 41 и 37 кДа (рис. 1, дорожка 1). Модификация метода выделения белков путем добавления ДНКазы I при гомогенизации клеток приводила к выявлению лишь одной полосы в области 42 кДа, более интенсивно окрашенной, чем при выделении белка стандартным методом (рис. 1, дорожка 2). Применение антител к актину млекопитающих ACTN05 (C4) не дало положительного результата. Антитела к кофилину человека и его фосфорилированной форме не взаимодействовали с белками на иммуноблоте.

**Тотальные препараты живых и фиксированных клеток.** При обработке фиксированных клеток антителами к актину 1-1 *P. aurelia* актин в ядерном аппарате не был выявлен, поэтому дальнейшая работа проводилась с использованием меченого фаллоидина как на живых, так и на фиксированных клетках.

Клетки *P. caudatum*, прижизненно помещенные в среду, содержащую глицерин, и затем обработанные ТРИТЦ-фаллоидином, имели наибольшую интенсивность флуоресценции в области макро- и микронуклеуса, а также ротового аппарата (рис. 2, а). Следует отметить, что распределение актина в макронуклеусе было неравномерным, а в микронуклеусе не окрашивалась ахроматиновая шапочка. На препаратах клеток, зафиксированных метанолом и обработанных ТРИТЦ-фаллоидином, помимо указанных структур были отчетливо видны пищеварительные вакуоли (рис. 2, б). При фиксации метанолом интенсивность флуоресценции в области ядерного аппарата сильно варьировалась, а фиксация с помощью парафор-

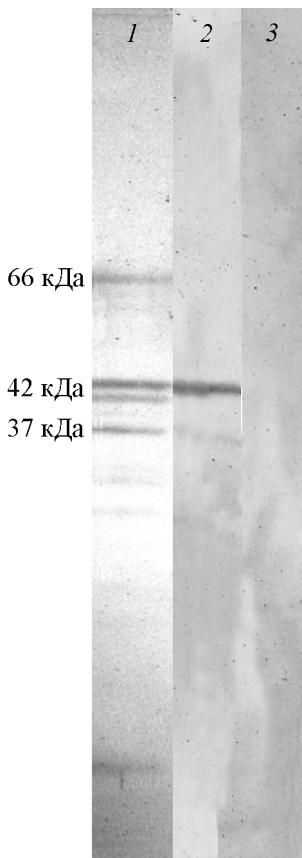


Рис. 1. Вестерн-блотинг totalного белка инфузории *Paramecium caudatum*, обработка антителами к актину 1-1 *P. aurelia*.  
Дорожка 1 — белок, выделенный стандартным методом; дорожка 2 — белок, выделенный в присутствии ДНКазы; дорожка 3 — контроль без первичных антител.

мальдегида не позволяла выявить содержащие актин структуры в клетке парамеции, что могло быть вызвано низкой проницаемостью пелликулы. В связи с этим была проведена обработка ТРИТЦ-фаллоидином парафиновых срезов клеток и выделенных ядер.

Гистологические срезы клеток и выделенные макронуклеусы. Использование срезов толщиной 5 мкм гарантирует проникновение антител и ТРИТЦ-фаллоидина внутрь клетки и ее ядра. Однако антитела к актину 1-1 *P. aurelia* не связывались с материалом ядра на срезах, тогда как ТРИТЦ-фаллоидин интенсивно окрашивал ядра и кортекс. При предобработке гистологических срезов протеиназой К флуоресценции не наблюдалось.

Проведенный с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии анализ препаратов выделенных макронуклеусов показал высокое содержание актина и вариабельность его распределения (рис. 3, а—б). Как правило, актин в макронуклеусах распределен равномерно по всему объему ядра, за исключением областей, соответствующих амплифицированным ядрышкам. В их области флуоресцентный маркер может вообще отсутствовать (рис. 3, а), однако в большинстве случаев фибриллярный актин с ними ассоциирован. В клетках культур логарифмической фазы роста актин преимущественно локализуется на границе активно транскрибирующих ядрышек и окружающего материала ядра и предположительно может быть связан с плотным фибриллярным компонентом, в то

время как в центральной области ядрышек наблюдается незначительная флуоресценция (рис. 3, б). В агрегированных ядрышках, формирующихся в голодающих клетках, актин выявляется в виде полых сферических образований, погруженных в общую массу ядрышка, свободную от актина (рис. 3, в). В затачках макронуклеусов клеток-эксонюгантов весь актин сконцентрирован в сферическом тельце, имеющем диаметр 1—3 мкм, в то время как окружающая нуклеоплазма не имеет сродства к фаллоидину (рис. 3, г).

С помощью антител к актину 1-1 *P. aurelia* и антител к актину млекопитающих нам не удалось продемонстрировать наличие актина в выделенных макронуклеусах, так же как на гистологических срезах и тотальных препаратах.

Интересно, что в стабильно зараженных внутриядерными эндобионтами макронуклеусах, за исключением небольших областей, флуоресценция ТРИТЦ-фаллоидина в ядре практически отсутствует, хотя актин, ассоциированный с пищеварительными вакуолями, находящимися в непосредственном контакте с ядром, легко детектируется (рис. 4). Необходимо отметить, что, несмотря на идентичные условия выделения ядер, результат заметно различался для зараженных и свободных от эндобионтов клеток. Зараженные клетки были более чувствительны к дегергенту, их макронуклеусы обладали существенно меньшей механической прочностью и легко теряли целостность.

Распределение кофилина и ф-кофилина. При использовании антител к кофилину флуоресценции не наблюдалось ни в ядерном аппарате инфузории, ни в ее цитоплазме, однако применение антител к его неактивной форме, ф-кофилину, продемонстрировало его скопление в макронуклеусе, причем исключительно в областях, предположительно соответствующих ядрышкам (рис. 5, а, б). В клетках, зараженных внутриядерными эндобионтами, отмечается диффузное перераспределение ф-кофилина из скоплений на периферию макронуклеуса, при этом в цитоплазме начинает детектироваться активная форма кофилина (рис. 5, в—д).

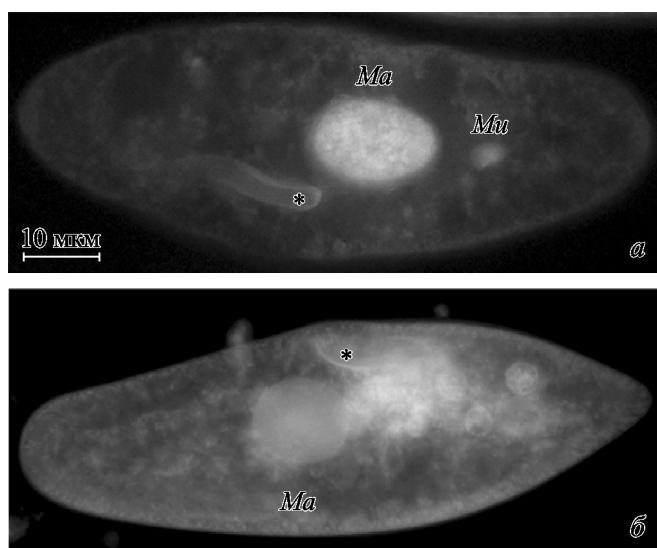


Рис. 2. Тотальный препарат *Paramecium caudatum*.

а — живая клетка, обработанная глицерином и окрашенная ТРИТЦ-фаллоидином; б — клетка, зафиксированная метанолом. Интенсивная флуоресценция наблюдается в области обоих ядер и ротового аппарата. Ma — макронуклеус, Mu — микронуклеус, звездочкой отмечен ротовой аппарат.

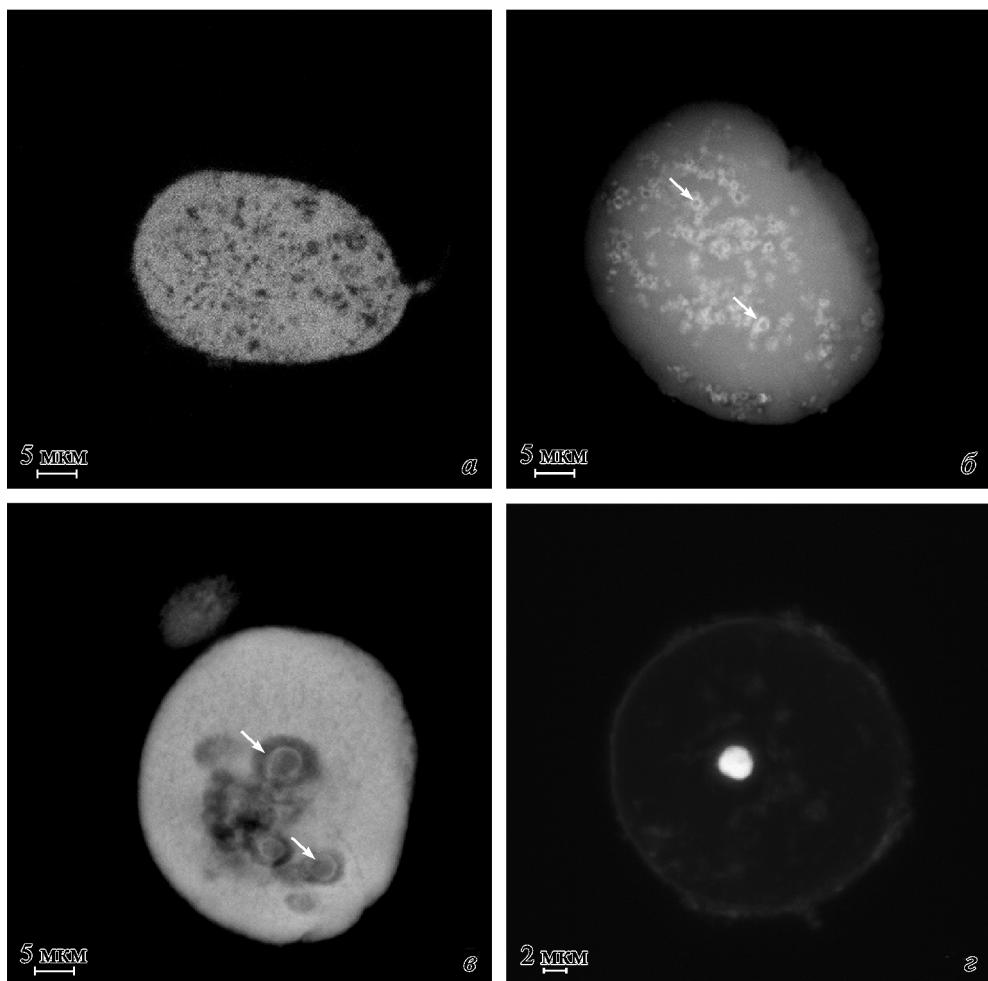


Рис. 3. Выделенные макронуклеусы *Paramecium caudatum*.

Обработка ТРИТЦ-фаллоидином. Конфокальная микроскопия, каждая фотография представляет собой суммарное изображение нескольких оптических срезов из средней части ядра. Распределение актина в макронуклеусах заметно варьирует. а — равномерное распределение по всему объему ядра, за исключением областей ядрышек; б — локализация актина в области амплифицированных ядрышек в клетках культур логарифмической фазы роста; в — локализация актина в агрегированных ядрышках голодающих клеток, стрелками отмечены области, предположительно соответствующие плотному фибрillлярному компоненту ядрышек; г — зачаток макронуклеуса *P. caudatum*, видно интенсивно флуоресцирующее сферическое тельце.

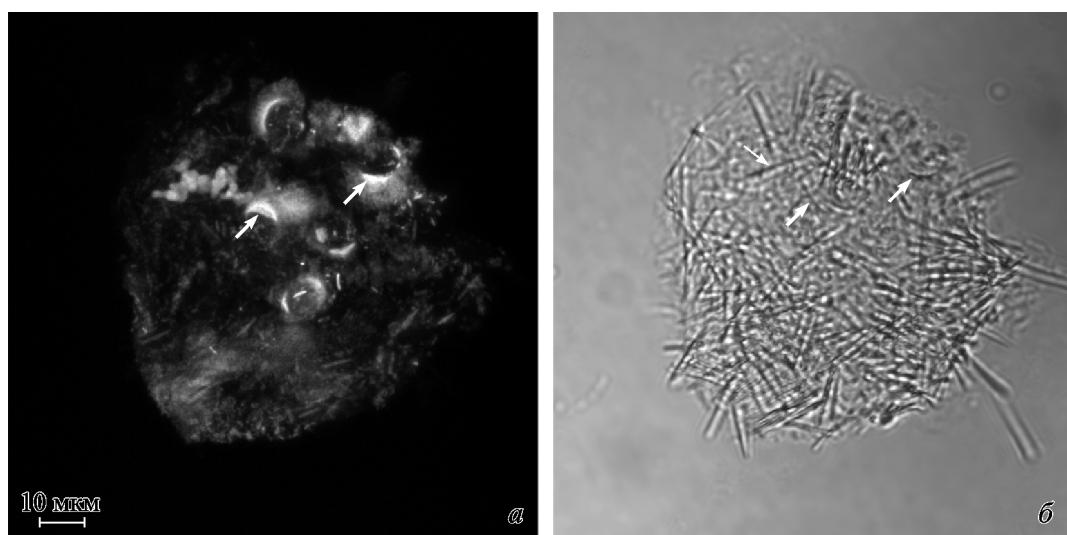


Рис. 4. Выделенный макронуклеус *Paramecium caudatum*, стабильно зараженный эндонуклеобионтом *Holospora obtusa*.

а — обработка ТРИТЦ-фаллоидином, конфокальная микроскопия, суммарное изображение нескольких оптических срезов; б — проходящий свет, тонкими стрелками отмечены бактерии в ядре, толстыми стрелками обозначены прилежащие к ядру пищеварительные вакуоли, ассоциированные с цитоплазматическим актином.

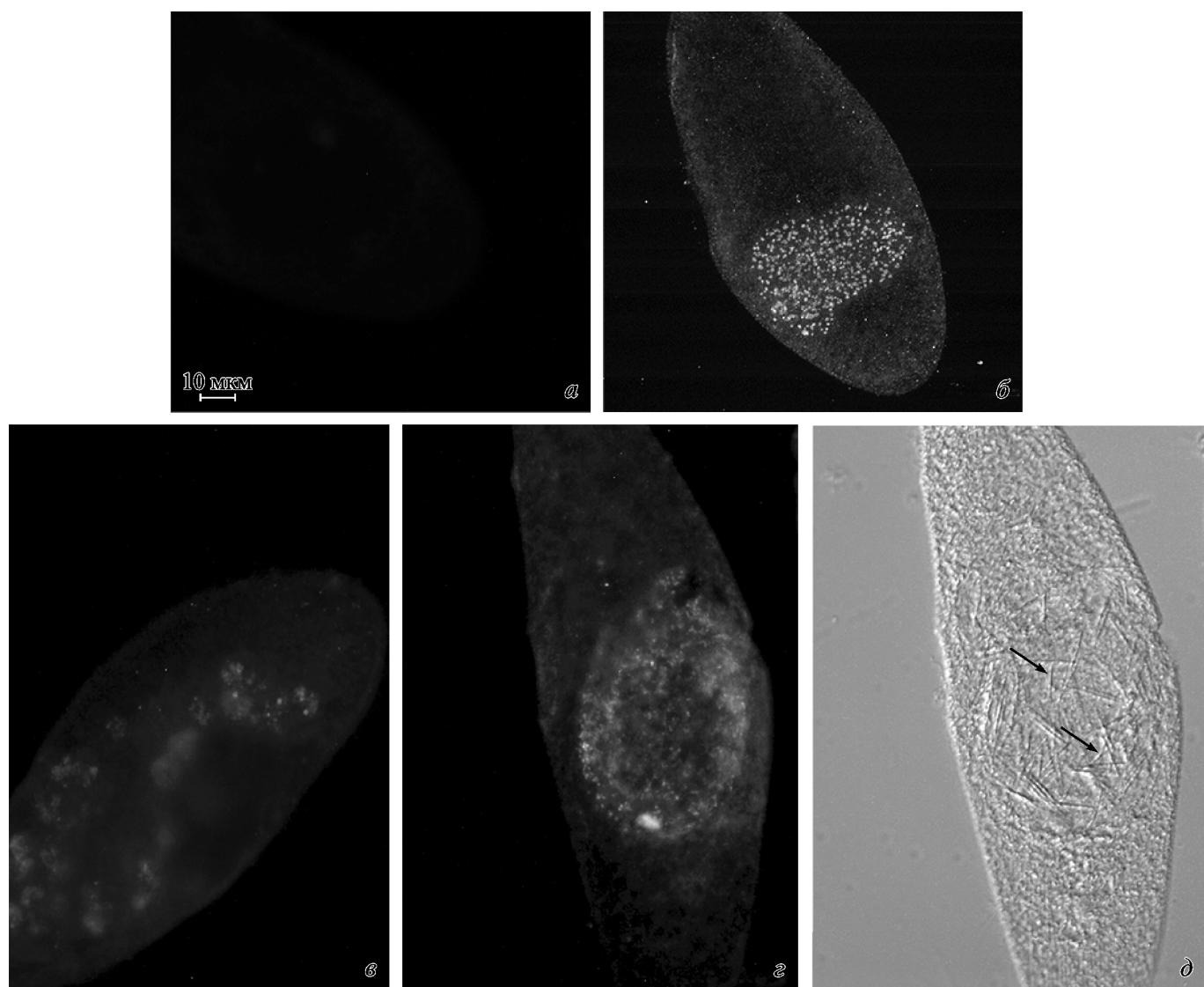


Рис. 5. Выявление кофилина (*а, в*) и ф-кофилина (*б, г*) на тотальных препаратах *Paramecium caudatum*.

*а, б* — не имеющая эндобионтов клетка; *в—д* — зараженная клетка; *д* — контраст Номарского, стрелками отмечены бактерии в макронуклеусе.

## Обсуждение

Присутствие в ядре различных форм актина (моно-mericной, олигомерной и полимерной), выполняющих специфические функции, в настоящее время можно считать хорошо установленным фактом (Pederson, 2008). Однако их выявление часто бывает затруднено в силу существования особых конформаций ядерного актина, не распознаваемых антителами, применяемыми для выявления актина в цитоплазме (Gonsior, 1999; Jockusch et al., 2006). Из трех маркеров, использованных нами для выявления актина в ядерном аппарате инфузории, только флуоресцентный фаллоидин, связывающийся с фибриллярным актином, дал положительный результат. Моноклональные антитела к актину млекопитающих не распознавали антиген ни на препаратах инфузорий, ни на иммуноблоте, что, скорее всего, свидетельствует об отсутствии специфичности к изоформам актина парамеций. Поликлональные антитела к актину 1-1 *P. aurelia* связывались с соответствующей полосой на блоте и выявляли содержащие актин структуры в цитоплазме (Sabaneyeva et al., 2009), однако

сигнала в ядре не наблюдалось ни на тотальных препаратах инфузорий, ни на срезах, ни в выделенных ядрах. Таким образом, несмотря на очевидную специфичность данных антител, они не способны распознавать актин ядерного аппарата. Это может объясняться тремя причинами: либо в ядре присутствует иная изоформа, например, актин 4-1 (Sehring et al., 2010); либо эпипот актина 1-1, распознаваемый используемыми антителами, в ядерном аппарате имеет измененную конформацию; либо данный эпипот занят специфическими для ядра связывающими актин белками.

В связи с высоким содержанием ДНК в макронуклеусах парамеций, существенно затруднявшим выделение из клеток тотального белка, процедура была модифицирована за счет добавления ДНКазы I. Следует отметить, что этот фермент обычно используется для очистки актина методом аффинной хроматографии (Schafer et al., 1998). Использование ДНКазы I не только заметно облегчало и ускоряло сам процесс, но и сокращало до одной (42 кДа) количество полос, с которыми связываются антитела к актину 1-1 (рис. 1). Исчезновение полос с более низкой мо-

лекулярной массой, по-видимому, связано с отсутствием протеолиза в условиях ускоренного выделения белка, тогда как исчезновение полосы, соответствующей белку с мол. массой 66 кДа, возможно, вызвано разрушением комплексов актина и ДНК. Если это предположение верно, то наличие полосы 66 кДа на блотах, полученных после электрофоретического разделения белков, выделенных без ДНКазы I, и отсутствие этой полосы при использовании ДНКазы I косвенно указывают на возможное присутствие изоформы актина 1-1 в ядерном аппарате парамеций. Тогда указанная изоформа в ядре либо имеет конформацию, отличную от цитоплазматической, либо ее эпигоп, распознаваемый специфичными антителами, закрыт какими-то связывающими актин молекулами.

Картина распределения актина в макронуклеусе, наблюдавшаяся после обработки флуоресцентным фаллоидином, больше всего напоминает изображения ядер ооцитов шпорцевой лягушки, полученные аналогичным способом (Morozova, Kiseleva, 2008). Известно, что для связывания фаллоида с фибрillой актина последняя должна иметь в своем составе не менее 7 протомеров (Vi-segrády et al., 2005). Таким образом, нам удалось показать существование в ядерном аппарате инфузории *P. caudatum* фибрill актина длиной как минимум 7 протомеров. Поскольку фибрillлярный актин не выявлялся в области интерхроматинового компартмента (центральной части ядрышек макронуклеуса и ароматиновой шапочки макронуклеуса), можно сделать вывод о том, что актин в ядре парамеции преимущественно связан с хроматином.

Применение конфокальной лазерной сканирующей микроскопии позволило обнаружить «обкладку» из актина по периферии ядрышек в клетках культур логарифмической фазы роста. Этот результат хорошо согласуется с данными других исследователей. Сосредоточение актина в околяядрышковой области неоднократно отмечалось ранее, причем не только в случае амплифицированных ядрышек ооцитов амфибий (Morozova, Kiseleva, 2008), но и для некоторых клеточных линий млекопитающих, в частности клеток карциномы молочной железы человека (Zhang et al., 2004). Интересно, что в лимфоцитах человека актин аккумулирован в фибрillлярных центрах ядрышек, и при активации клеток происходит его перераспределение в область плотного фибрillлярного компонента (Kiselá et al., 2005). Более того, существует мнение, согласно которому актомиозиновые комплексы опосредуют взаимодействие РНК-пол I и рДНК (Grummt, 2006; Ye et al., 2008).

Ранее нами были получены данные, свидетельствовавшие в пользу того, что у парамеций фибрillлярные центры и сайты транскрипции находятся на периферии ядрышек (Sabaneyeva, 1997). Расположение рибосомных генов в инвагинациях хроматина по краю ядрышек было продемонстрировано и для другого представителя инфузорий — *Styloynchia lemnae* (Postberg et al., 2006). Поэтому можно предположить, что в макронуклеусах инфузорий актин принимает участие в транскрипции, которая осуществляется на поверхности амплифицированных ядрышек. Полые сферы из фибрillлярного актина, обнаруженные в агрегированном ядрышке, формирующимся в голодающих клетках, по-видимому, соответствуют перераспределившемуся плотному фибрillлярному компоненту.

Интересно, что, по нашим данным, в ядрышках локализована инактивированная форма связывающего актин белка кофилина (ф-кофилин). В активной форме кофилин способствует разборке актиновых филаментов (Theriot,

1997), поэтому присутствие в ядре инактивированной формы может быть дополнительным аргументом в пользу преобладания в макронуклеусе именно фибрillлярного актина. Тот факт, что ф-кофилин сконцентрирован в области ядрышек, хорошо согласуется с современными представлениями об их функциях. В настоящее время ядрышку приписывают способность заакорчивать (секвестрировать) временно инактивированные белки (Olson et al., 2000). Однако поскольку нам не удалось получить положительные результаты с помощью антител к кофилину и его инактивированной форме в иммуноблоте, нельзя исключить возможность неспецифического связывания антител с фосфорилированным эпигопом какого-то другого белка, тем более что маркерные белки ядрышек тоже фосфорилированы (Satoh, Busch, 1981). В то же время появление слабого сигнала в цитоплазме при обработке антителами к кофилину клеток, макронуклеус которых заражен внутриядерными эндобионтами, скорее всего, свидетельствует об обратном.

Перераспределение ф-кофилина в зараженных клетках требует особого обсуждения. Его дисперсия по макронуклеусу и появление активированной формы в цитоплазме могут говорить о нарушении целостности ядерных субкомпартментов, вызванном присутствием в макронуклеусе эндобионтов. Здесь следует упомянуть о том, что в макронуклеусах клеток, несущих внутриядерные бактерии, фибрillлярный актин почти не выявлялся, что, по-видимому, свидетельствует о существенных изменениях в архитектуре зараженного ядра. Возможно, именно со снижением содержания фибрillлярного актина в зараженных макронуклеусах может быть связана их меньшая механическая прочность по сравнению с незараженными ядрами. Присутствие фибрillлярного актина в ядре было показано ранее для гигантских ядер ооцитов амфибий (Parfenov et al., 1995; Morozova, Kiseleva, 2008). На этом основании можно предположить, что фибрillлярный актин участвует в поддержании формы и целостности макронуклеуса, как и в гигантских ядрах ооцитов шпорцевой лягушки (Bohnsack et al., 2006).

Сферическое тельце, обнаруженное в зачатках макронуклеусов эксконьюгантов, возможно, представляет собой структуру, аналогичную кариосфере, формирующуюся в ядре ооцита при инактивации транскрипции в ходе оогенеза (Gruzova, Parfenov, 1993). По-видимому, в нем содержится материал транскрипционно неактивного синкариона, из которого образуется зачаток макронуклеуса. В процессе развития макронуклеуса и активации транскрипции, очевидно, происходит разборка сферического тельца. Присутствие актина в кариосфере ядер ооцитов златоглазок было показано ранее (Rubsam, Büning, 2001).

Таким образом, проведенное нами исследование позволило продемонстрировать высокое содержание фибрillлярного актина и существенное изменение характера его распределения в макронуклеусах в зависимости от физиологического состояния клетки. Кроме того, появляются основания проводить параллели между моррофункциональной организацией гигантских ядер ооцитов амфибий и амплиплоидных макронуклеусов инфузорий: ядра обоих типов обогащены фибрillлярным актином, который играет важную роль в обеспечении механической прочности ядра и часто ассоциирован с транскрипционно активными амплифицированными ядрышками.

Авторы выражают свою искреннюю благодарность проф. Х. Платтнеру и И. Серинг (Университет Костанца,

Германия) за любезно предоставленные ими антитела к актину 1-1 *P. aurelia*. Мы признательны М. С. Раутиан и И. И. Скобло за предоставленный в наше распоряжение клон, несущий эндобионты, а также Т. Г. Шапошниковой за помочь при проведении электрофореза.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской фонда фундаментальных исследований (проект 11-04-01882-а).

### Список литературы

- Боголюбова Н., Боголюбова И. 2009. Локализация актина в ядрах двухклеточных зародышей мыши. Цитология. 51 (8) : 663—669.
- Райков И. Б. 1978. Ядро простейших. Л., Наука, 328 с.
- Bohnsack M., Stuven T., Kuhn C., Cordes V., Gorlich D. 2006. A selective block of nuclear actin export stabilizes the giant nuclei of *Xenopus* oocytes. Nat. Cell Biol. 8 : 257—263.
- Dingová H., Fukalová J., Maninová M., Philimonenko V., Hozák P. 2009. Ultrastructural localization of actin and actin-binding proteins in the nucleus. Histochem. Cell Biol. 131 : 425—434.
- Egly J., Miyamoto N., Moncollin V., Chambon P. 1984. Is actin a transcription initiation factor for RNA polymerase B? EMBO J. 3 : 2363—2371.
- Fukui Y. 1978. Intranuclear actin bundles induced by dimethyl sulfoxide in interphase nucleus of Dictyostelium. J. Cell Biol. 76 : 146—157.
- Gettemans J., Van Impe K., Delanote V., Hubert T., Vandekerckhove J., De Corte V. 2005. Nuclear actin-binding proteins as modulators of gene transcription. Traffic. 8 : 847—857.
- Gönsior S., Platz S., Buchmeier S., Scheer U., Jockusch B., Hinssen H. 1999. Conformational difference between nuclear and cytoplasmic actin as detected by a monoclonal antibody. J. Cell Sci. 112 : 797—809.
- Grummt I. 2006. Actin and myosin as transcription factors. Curr. Opin. Gen. Develop. 16 : 191—196.
- Gruzova M., Parfenov V. 1993. Karyosphere in oogenesis and intranuclear morphogenesis. Int. Rev. Cytol. 144 : 1—52.
- Hauser M. 1973. Aktomyosinartige Filamente im Teilungsmakronukleus des Ciliaten *Ichthyophthirius multifiliis*. Chromosoma. 44 : 49—71.
- Hu P., Wu S., Hernandez N. 2004. A role for beta-actin in RNA polymerase III transcription. Genes Develop. 18 : 3010—3015.
- Jockusch B. M., Schoenenberger C.-A., Stetefeld J., Aebi U. 2006. Tracking down the different forms of nuclear actin. Trends Cell Biol. 16 : 391—396.
- Kersken H., Momayezi M., Braun C., Plattner H. 1986. Filamentous actin in *Paramecium* cells: functional and structural changes correlated with phalloidin affinity labeling *in vivo*. J. Histochem. Cytochem. 34 : 455—465.
- Khaitlina S. Yu. 2001. Functional specificity of actin isoforms. Int. Rev. Cytol. 202 : 35—98.
- Kiselá K., Philimonenko A., Philimonenko V., Janáček J., Kahle M., Hozák P. 2005. Nuclear distribution of actin and myosin I depends on transcriptional activity of the cell. Histochem. Cell Biol. 124 : 347—358.
- Kukalev A., Nord Y., Palmberg C., Bergman T., Percipalle P. 2005. Actin and hnRNP U cooperate for productive transcription by RNA polymerase II. Nat. Struct. Mol. Biol. 12 : 238—244.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature. 4 : 680—682.
- Méténier G. 1984. Actin in *Tetrahymena paravorax*: ultrastructural localization of HMM-binding filaments in glycerinated cells. J. Protozool. 31 : 205—215.
- Morozova K. N., Kiseleva E. V. 2008. Nuclear and cytoplasmic organization in *Xenopus* oocytes after disruption of actin filaments by latrunculin. Cell Tissue Biol. 3 : 300—310.
- Nowak G., Pestic-Dragovich L., Hozák P., Philimonenko A., Simerly C., Schatten G., de Lanerolle P. 1997. Evidence for the presence of myosin I in the nucleus. J. Biol. Chem. 272 : 17 176—17 181.
- Olson M., Dundr M., Szebeni A. 2000. The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. Trends Cell Biol. 10 : 189—196.
- Parfenov V., Davis D., Pochukalina G., Sample C., Bugaeva E., Murti K. 1995. Nuclear actin filaments and their topological changes in frog oocytes. Exp. Cell Res. 217 : 385—394.
- Pederson T. 2008. As functional nuclear actin comes into view, is it globular, filamentous, or both? J. Cell Biol. 180 : 1061—1064.
- Pederson T., Aebi U. 2005. Nuclear actin extends, with no contraction in sight. Mol. Biol. Cell. 16 : 5055—5060.
- Percipalle P., Visa N. 2006. Molecular functions of nuclear actin in transcription. J. Cell Biol. 172 : 967—71.
- Philimonenko V. V., Zhao J., Iben S., Dingová H., Lanerolle P., Kyselá K., Hozák P., Kahle M., Grummt I. 2004. Nuclear actin and myosin I are required for RNA polymerase I transcription. Nat. Cell Biol. 6 : 1165—1172.
- Pomorsky P., Grebecka L. 1995. Nuclear movements and nuclear actin in bilobed nuclei of *Amoeba proteus*. Eur. J. Protistol. 3 : 260—267.
- Postberg J., Alexandrova O., Lipps H. J. 2006. Synthesis of pre-rRNA and mRNA is directed to a chromatin-poor compartment in the macronucleus of the spirotrichous ciliate *Stylonychia lemnae*. Chromosome Res. 14 : 161—175.
- Raikov I. B. 1982. The protozoan nucleus. Morphology and evolution. Wien; New York: Springer-Verlag. 484 p.
- Rübsam R., Büning J. 2001. F-actin is a component of the karyosome in the neuropteran oocyte nuclei. Arthr. Str. Develop. 30 : 125—133.
- Sabaneyeva E. V. 1997. Extrachromosomal nucleolar apparatus in the macronucleus of the ciliate *Paramecium putrinum*: LM, EM and confocal microscopy studies. Arch. Protistenkd. 148 : 365—373.
- Sabaneyeva E. V., Derkacheva M. V., Benken K. A., Fokin S. I., Vainio S., Skovorodkin I. N. 2009. Actin-based mechanism of *Holospora obtusa* trafficking in *Paramecium caudatum*. Protist. 160 : 205—219.
- Satoh K., Busch H. 1981. Silver staining of phosphoserine and phosphothreonine in nucleolar and other phosphoproteins. Cell Biol. Int. Rep. 5 : 857—866.
- Schafer D., Jennings P., Cooper J. 1998. Rapid and efficient purification of actin from non-muscle sources. Cell Motil. Cytoskel. 39 : 166—171.
- Scheer U., Hinssen W., Franke W., Jockusch B. 1984. Microinjection of actin-binding proteins and actin antibodies demonstrates involvement of nuclear actin in transcription of lampbrush chromosomes. Cell. 39 : 111—122.
- Schoenenberger C.-A., Buchmeier S., Boerries M., Sutterlin R., Aebi U., Jockusch B. 2005. Conformation-specific antibodies reveal distinct actin structures in the nucleus and the cytoplasm. J. Struct. Biol. 152 : 157—168.
- Sehring I. M., Reiner C., Mansfeld J., Plattner H., Kissmehl R. 2007. A broad spectrum of actin paralogs in *Paramecium tetraurelia* cells display differential localization and function. J. Cell Sci. 120 : 177—190.
- Sehring I. M., Reiner C., Plattner H. 2010. The actin subfamily PtAct4, out of many subfamilies, is differentially localized for specific local functions in *Paramecium tetraurelia* cells. Eur. J. Cell Biol. 89 : 509—524.
- Sonneborn T. M. 1970. Methods in *Paramecium* research. In: Methods in cell physiology. New York: Acad. Press. 4 : 241—339.
- Soyer-Gobillard M.-O., Ausseil J., Geraud M. 1996. Nuclear and cytoplasmic actin in dinoflagellates. Bid. Cell. 87 : 17—35.
- Therriot J. 1997. Accelerating on a treadmill: ADF/cofilin promotes rapid actin filament turnover in the dynamic cytoskeleton. J. Cell Biol. 136 : 1165—1168.
- Van Gestel K., Le J., Verbelen J.-P. 2001. A comparison of F-actin labeling methods for light microscopy in different plant spe-

- cimens: multiple techniques supplement each other. *Micron.* 32 : 571—578.
- Vartiainen M. K., Guettler S., Larijani B., Treisman R. 2007. Nuclear actin regulates dynamic subcellular localization and activity of the SRF cofactor MAL. *Science.* 316 : 1749—1752.*
- Villalobos E., Pérez-Romero P., Sánchez-Silva R., Torres A. 2001. Unusual characteristics of ciliate actins. *Int. Microbiol.* 4 : 167—174.*
- Visegrády B., Lörinczy D., Hild G., Somogyi B., Nyitrai M. 2005. A simple model for the cooperative stabilization of actin filaments by phalloidin and jasplakinolide. *FEBS Lett.* 579 : 6—10.*
- Wada A., Fukuda M., Mishima M., Nishida E. 1998. Nuclear export of actin: a novel mechanism regulating the subcellular localization of a major cytoskeletal protein. *EMBO J.* 17 : 1635—1641.*
- Ye J., Zhao J., Hoffmann-Rohrer U., Grummt I. 2008. Nuclear myosin I acts in concert with polymeric actin to drive RNA polymerase I transcription. *Genes Develop.* 22 : 322—330.*
- Zhang S., Köhler C., Hemmerich P., Grosse F. 2004. Nuclear DNA helicase II (RNA helicase A) binds to an F-actin containing shell that surrounds the nucleolus. *Exp. Cell Res.* 293 : 248—258.*
- Zhao K., Wang W., Rando O. J., Xue Y., Swiderek K., Kuo A., Crabtree G. R. 1998. Rapid and phosphoinositol-dependent binding of the SWI/SNF-like BAF complex to chromatin after T lymphocyte receptor signaling. *Cell.* 95 : 625—636.*

Поступила 1 III 2011

#### FIBRILLAR ACTIN IN THE NUCLEAR APPARATUS OF THE CILIATE *PARAMECIUM CAUDATUM*

K. A. Benken, E. V. Sabaneyeva

St. Petersburg State University, Department of Cytology and Histology;  
e-mail: [saban@mail333.com](mailto:saban@mail333.com)

Due to their nuclear dualism, ciliates provide a good model for studying the role of actin in spatial organization and transcription activity of the nucleus. The actin in the nuclear apparatus of the ciliate *Paramecium caudatum* was studied using fluorescently labeled phalloidin and indirect immunocytochemistry. Fibrillar actin was demonstrated in both of the nuclei. Actin was revealed in the chromatin areas, and was often associated with the periphery of the amplified nucleoli in the macronucleus. Redistribution of actin was observed depending on different physiological state of the cells. Stable infection of the macronuclear with the intranuclear endobionts *Holospora obtuse* led to the loss of nuclear actin accompanied by significant nuclear fragility and redistribution of the phosphorylated form of the actin-binding protein cofilin. Spherical bodies resembling karyosphere were found in the macronuclear anlagen.

**Key words:** nuclear actin, ciliates, nuclear dualism, macronucleus, amplified nucleoli, cofilin, intranuclear endobionts.