

## ОРГАНИЗАЦИЯ ХРОМАТИНА В КЛЕТОЧНОМ ЦИКЛЕ *АМОЕБА PROTEUS* ПО ДАННЫМ ОПТИЧЕСКОЙ ТОМОГРАФИИ

© С. Ю. Демин, М. А. Бердиева, Ю. И. Подлипаева, А. Л. Юдин, А. В. Гудков<sup>1</sup>

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

<sup>1</sup> электронный адрес: pelgood1@gmail.com

Впервые ядерный цикл у крупных пресноводных амёб *Amoeba proteus* исследовали методом оптической томографии. Ядра, фиксированные *in situ* в клетках синхронизированной культуры, окрашивали DAPI и исследовали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа. Трёхмерные изображения внутриядерного хроматина подробно анализировали на разных стадиях ядерного цикла. Полученный материал в совокупности с имеющимися в литературе данными позволяет совершенно по-новому представить динамику структурной организации ядра в клеточном цикле *A. proteus*. Сделано заключение, что у амёб имеет место двухэтапная интерфаза и митоз особого типа, не соответствующий ни одному из известных типов в существующей классификации митозов. Высказано предположение, что в цикле происходит амплификация хромосом и (или) их участков, что хорошо согласуется с имеющимися данными о гиперрепликации ядерной ДНК в клеточном цикле *A. proteus*. Из-за амплификации число хромосом может быть разным на разных стадиях цикла, что позволяет объяснить существующие в литературе противоречия в оценке числа хромосом у этого вида. Элиминация «избыточной» ДНК происходит главным образом на этапе перехода от профазы к прометафазе. Наконец, особенности поведения хромосом в митозе позволяют заключить, что многие из них, если не все, относятся к голоцентрическому типу.

Ключевые слова: *Amoeba proteus*, ядерный цикл, конфокальная микроскопия, оптическая томография, организация хроматина.

Свободноживущие амёбы, главным образом *Amoeba proteus* и близкие виды, уже больше двух столетий служат моделью эукариотической клетки в многочисленных и разнообразных цитологических исследованиях. Результатам этих исследований время от времени посвящались специальные сводки и обзоры (Jeon, 1973, 1995; Yudin, 1990). В 1959 г. журнал «Annals of the New York Academy of Sciences» посвятил специальный выпуск (том 78) результатам исследований биологии амёбы разных авторов. Однако до сих пор целый ряд ключевых моментов в биологии этих облигатно агамных простейших остается нерасшифрованным. В частности, это касается фундаментальных проблем структуры и функциональной активности их ядер. Так, у *A. proteus* в ядерном цикле отсутствует фаза G<sub>1</sub>, и синтез ДНК начинается сразу после деления клетки (Ord, 1968; Ron, Prescott, 1969; Prescott, 1987). Обнаружено загадочное явление гиперрепликации ядерной ДНК — к концу ядерного цикла количество ДНК в ядре может более чем втрое превышать таковое в начале цикла, однако в дальнейшем «избыточная» ДНК элиминируется (Makhlin et al., 1979; Афонькин, 1983; Махлин, 1987, 1993; Afon'kin, 1989). Преобладающая доля наследственной межклеточной изменчивости хотя и контролируется ядром клетки, но имеет, по всей видимости, эпигенетическую природу (Юдин, 1982).

Наконец, до сих пор нет единого мнения о числе хромосом. Принято считать, что хромосомы *A. proteus* очень мелкие, их число достигает 500 или более (Ord, 1973;

Yudin, 1990; Марахова и др., 1993; Махлин, 1993), но эти данные носят лишь предположительный характер. Остается открытым вопрос и об уровне ploидности у этого вида, хотя полиплоидность ядра у этих организмов неоднократно «подозревали» (Ord, 1973; Raikov, 1982; Afon'kin, 1989; Махлин, 1993). Список можно продолжить, и совершенно ясно, что этот классический модельный объект предоставляет широкие возможности для дальнейших исследований.

Строение ядра, структуру хроматина и хромосомный аппарат *A. proteus* до сих пор исследовали традиционными методами световой и электронной микроскопии (Liesche, 1938; Roth et al., 1960; Roth, 1967; Daniels, 1973; Flietinger, 1974; Goldstein, Ko, 1978; Ord, 1979; Gromov, 1985; Page, 1986). В настоящее время с появлением новых методов получения и обработки микроскопических данных, в частности конфокальной микроскопии, технологии оптической томографии объекта и получения трехмерных (3D) изображений, появилась возможность переисследовать имеющиеся противоречивые данные о структуре и динамике хроматина в ядре *A. proteus* на протяжении клеточного цикла. Задачу облегчает недавно разработанный нами новый метод синхронизации клеток в культуре и очистки цитоплазмы амёб от остатков пищеварительных вакуолей (Podlipaeva et al., 2013). В настоящей статье представлены первые результаты оптической томографии ядра *A. proteus* на разных стадиях ядерного цикла.

## Материал и методика

Исследовали клетки амёб *Amoeba proteus* штамма «В» из коллекции Института цитологии РАН (Goodkov et al., 2014). Амёб культивировали по стандартной методике на минеральной среде Прескотта (Prescott, Carrier, 1964) при комнатной температуре, каждые 48 ч кормили инфузориями *Tetrahymena pyriformis* GL (Юдин, 1975).

Не менее чем за 72 ч до проведения фиксации кормление инфузориями прекращали и производили трехкратную смену среды. Затем амёб переводили на новый режим питания, используя в качестве среды белок перепелиных яиц, разбавленный средой Прескотта в пропорции 1 : 2, по методике, описанной нами ранее (Podlipaeva et al., 2013). В такой среде амёбы переходят к питанию макропиноцитозом, а их цитоплазма постепенно очищается от остатков пищеварительных вакуолей. При этом происходит почти 80%-ная синхронизация клеток в культуре по ядерному циклу. Затем таких амёб фиксировали после отмывки свежей средой Прескотта.

Изготовление препаратов осуществляли по методу, разработанному для клеток насекомых (Hulsebos et al., 1984). Сгущенную суспензию амёб в среде Прескотта с помощью микропипетки наносили на желатинизированное предметное стекло. Затем быстро накрывали клетки покровным стеклом 24×24 мм, обработанным силиконом SL-2 (Sigma, США), и мягко придавливали, оттягивая лишнюю жидкость. Полученный препарат клеток немедленно погружали в жидкий азот. После 4—5 с охлаждения препарат извлекали из азота и с помощью бритвенного лезвия быстро отделяли от него покровное стекло. Сразу после этого клетки фиксировали в 2%-ном растворе формальдегида, приготовленного из параформальдегида (Sigma, США), на 96%-ном этаноле в течение 30 мин при комнатной температуре. После отмывки препарата в трех сменах PBS осуществляли пермеабиллизацию клеток 0.5%-ным водным раствором неполярного детергента Triton X-100 (Ferak, Германия). После отмывки детергента в свежей порции PBS клетки окрашивали с помощью DAPI (AppliChem, Германия) — АТ-специфичного флуоресцирующего красителя нуклеиновых кислот. Использовали свежеприготовленный рабочий раствор DAPI (1 мкг/мл) на буфере Мак-Илвейна (pH 7.0). Заключение в глицерин препараты хранили при –20 °С до использования.

Первичный отбор клеток на препарате для последующего анализа на конфокальном микроскопе проводили с помощью метода фазового контраста на микроскопе Leica DM2500 (Leica Wetzlar GmbH, Германия). Изображения серийных оптических срезов ядер, окрашенных DAPI (толщиной 0.05 мкм), получали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Leica TCS SP5 (Leica Wetzlar GmbH, Германия), используя объектив 100×/1.4 МИ.

Для получения 3D-реконструкций ядер, окрашенных DAPI, использовали программу ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>), а также дополнительный модуль ImageJ 3D Viewer (<http://3dviewer.neurofly.de/>). Встроенный модуль позволяет вращать реконструкцию ядра слева направо по оси Y конфокального микроскопа, дополнительный модуль может это делать по любой из осей в любом направлении. Вместе с тем дополнительный модуль содержит в себе фильтр сигналов, который по умолчанию установлен на минимум. Однако даже при такой установке ImageJ 3D Viewer отсекает как «шум» все структуры

диффузного хроматина, которые хорошо регистрируются с помощью встроенного модуля.

Оба модуля могут работать в нескольких режимах. Мы протестировали все из них применительно к нашей задаче — исследованию архитектуры хроматиновых структур клеточного ядра *A. proteus*. Оказалось, что встроенный модуль оптимальным образом работает в стандартном режиме (brightest spot) с включением интерполяции (interpolate) данных. Аналогичная ситуация — с ImageJ 3D Viewer, однако в этом случае стандартный режим (volume) лучше всего дополнить введением в изображение системы координат.

Сильно уплощенные нативные ядра *A. proteus* гораздо проще поддаются структурному анализу с помощью реконструкции методами оптической томографии по сравнению с эллипсоидными или сфероидными ядрами других клеток. Поэтому оказывается, что достаточно обойтись сопоставлением относительно небольшого числа 3D-проекций. В дальнейшем нам представляется более удобным вместо употребления слов «3D-проекция» использовать слово «ракурс», хотя основной смысл этого слова в русском языке несколько иной.

Архитектуру хроматина уплощенных ядер амёб проще всего интерпретировать при рассматривании их в нескольких ракурсах. Во-первых, это вид сверху и снизу на широкую сторону ядра; в морфометрии — это вид на плоскости ядра XY и -XY, которые задаются пересечением его большого и малого диаметров. При этом верхом можно считать сторону ядра, которая ближе к апикальной поверхности клетки, а низом — ту, что ближе к ее базальной поверхности (поверхности предметного стекла). Во-вторых, это вид на узкую сторону ядра, точнее на плоскости ядра YZ, -YZ, XZ и -XZ, которые перпендикулярно пересекают линии большого и малого диаметров и плоскости XY и -XY. В-третьих, желательнее рассмотреть ядро в тангенциальном ракурсе, т. е. в таком положении, когда кроме широкой (узкой) стороны под небольшим углом видна еще и его узкая сторона (часть широкой). Указанные ракурсы мы условно обозначили как апикальный, базальный, поперечный и тангенциальный соответственно.

Что касается сопоставления изображений сходных ракурсов, полученных с помощью разных модулей, отметим, что число ракурсов, которые можно получить с помощью встроенного модуля, равно числу оптических секций. В нашем случае их было 36. Дополнительный модуль дает возможность получать многократно большее число изображений практически любых ракурсов клеточного ядра. Однако в обоих случаях далеко не все из них оказываются достаточно информативными в силу падения разрешения хроматиновых структур. По этой причине количество информативных ракурсов в случае встроенного модуля снижается до девяти: апикального, тангенциально-апикального, двух практически зеркально симметричных поперечных, двух почти зеркально симметричных тангенциально-поперечных, двух похожих друг на друга тангенциально-базальных и одного базального ракурса. Если пренебречь симметричными и слабо отличимыми изображениями, то останется всего шесть «полезных» ракурсов. Это максимально возможное число ракурсов, которое имеет смысл анализировать при очень детальном исследовании архитектоники хроматиновых структур. Если же такая задача не ставится, то для получения общей картины организации хроматина оказывается вполне достаточно четырех ракурсов — апикального,

поперечного, одного из тангенциальных и базального. Поэтому мы отбирали эти четыре 3D-проекции ядра. Каждый отобранный ракурс сохраняли в качестве отдельного изображения с помощью программы ImageJ. Необходимую обработку изображений (удаление «шумов», усиление контраста и т. п.) производили с помощью программы Adobe Photoshop 7.0, как было подробно описано ранее (Demin et al., 2011).

## Результаты и обсуждение

При описании и анализе структуры хроматина следует иметь в виду специфические особенности морфологии ядер и протекания ядерного цикла у *Amoeba proteus*.

Как известно, интактное ядро амебы может иметь форму от правильной дисковидной до вытянутой овальной или неправильной изогнутой с небольшими выступами ядерной оболочки. Непосредственно под внутренней мембраной ядерной оболочки располагается относительно толстый слой пространственноорганизованного фибриллярного материала — так называемый сотовый слой (Daniels, 1973; Gromov, 1985; Page, 1986). В ядре содержится большое количество электронно-плотных внутриядерных телец неправильной формы, большинство которых располагается на периферии ядра. В литературе эти образования называются «ядрышками» или «ядрышкоподобными» тельцами, однако их молекулярная природа до сих пор окончательно не изучена (Борисенко и др., 2010).

Ядерный цикл *A. proteus* характеризуется следующими особенностями.

1. Считается, что фаза  $G_1$  в митотическом цикле либо вовсе отсутствует (синтез ДНК начинается сразу после деления клеток), либо очень кратковременна, не более 15 мин (Ord, 1968, 1971; Ron, Prescott, 1969; Махлин, 1987, 1993; Prescott, 1987).

2. Отсутствует четкая граница фазы S, и синтез ДНК нередко может осуществляться вплоть до деления (Spear, Prescott, 1980; Prescott, 1987; Махлин, 1993).

3. В ходе репликативного цикла у *A. proteus* происходит более чем двукратное, а иногда и более чем трехкратное увеличение содержания ДНК по сравнению с ядрами молодых клеток через 1 ч после митоза (Makhlin et al., 1979; Афонькин, 1983; Махлин, 1987, 1993). Однако такое «гиперплоидное» состояние ядра является временным, и впоследствии часть ДНК каким-то образом элиминируется, так что в конечном итоге ее количество начинает приближаться к удвоенному. Считается, что это происходит на стадии  $G_2$ , но нельзя исключить, что и позже, например, в профазе.

4. У *A. proteus*, согласно Громову (Gromov, 1985), происходит митотическая конденсация хромосом. В указанной работе представлено электронно-микроскопическое изображение тангенциального среза метафазной пластинки с плотно упакованными короткими хромосомами и отходящими от них в одну сторону микротрубочками веретена. Центров организации микротрубочек при этом не найдено. В метафазном ядре отсутствуют внутриядерные тельца и «сотовый слой», но сохраняются обширные фрагменты ядерной оболочки.

Представляется вполне очевидным, что за счет митотической конденсации хроматина и «исчезновения» избыточной ДНК позднепрофазные ядра будут иметь существенно меньшие размеры, чем интерфазные ядра в конце

фазы S и начале фазы  $G_2$ , а также содержать более конденсированные и укороченные хромосомы, чем любые интерфазные ядра. Сказанного выше вполне достаточно для идентификации профазных ядер на препаратах. Как оказалось, они соответствуют ядрам с выступами. Результаты реконструкции апикального, поперечного, тангенциального и базального ракурсов профазного ядра представлены на рис. 1.

Архитектура ядерного хроматина в апикальном ракурсе представлена на реконструкциях, выполненных с помощью встроенного (рис. 1, а) и дополнительного (рис. 1, а) модулей. Благодаря графу координатной оси видно, что апикальная поверхность ядра располагается под углом к поверхности предметного стекла (оси XY микроскопа). На периферии ядра располагаются относительно крупные хромосомоподобные фибриллы разной длины. Они имеют хромомероподобную (бусовидную) структуру. На реконструкции, полученной встроенным модулем, отчетливо видно, что такие фибриллы окружены 0.5-микронным слоем диффузного хроматина. На реконструкции, сгенерированной дополнительным модулем, диффузный слой хроматина отсутствует, однако на расстоянии около 0.5 мкм от периферических фибрилл конденсированного хроматина выявляются обособленные мини-фокусы DAPI-флуоресценции, маркирующие их наружную границу. Скорее всего, такое устройство периферийных хромосомоподобных фибрилл свидетельствует о наличии в них латеральных хроматиновых петель, часть из которых закоривается на ядерной оболочке.

Центральная часть ядра достаточно рыхло заполнена более тонкими и короткими хромосомоподобными фибриллами конденсированного хроматина. Большинство из них также имеет бусовидную структуру. Кроме этих телец здесь встречаются короткие нити слабо окрашенного хроматина. Эти нити лучше разрешаются встроенным модулем, тогда как дополнительный модуль их обычно «вычищает», принимая за «шум». Общее число хромосомоподобных фибрилл в центральной части ядра можно оценить в 5—7 десятков, тогда как число периферийных — не более 2 десятков.

В верхней части изображения ядра и в его центральной части располагаются ахроматиновые домены. Можно предположить, что они заполнены внутриядерными тельцами. По нашим данным, полученным в ходе прижизненных наблюдений клеток амеб изучаемого штамма «В» с использованием DIC-микроскопии и объектива 100× МИ, такие тельца во множестве просматриваются внутри ядер с выступами. Создается впечатление, что кольцо из периферических хромосомных фибрилл в значительной степени пространственно обособлено от остального хроматина.

Поперечный и тангенциально-поперечный ракурсы ядра, реконструированные с помощью как встроенного (рис. 1, б, в), так и дополнительного (рис. 1, б', в') 3D-модулей программы ImageJ, отчетливо демонстрируют двухслойную организацию хроматина профазного ядра. Верхний — более тонкий и широкий слой в этих ракурсах — выглядит как сплошной. Он состоит из диффузного (разрыхленного) хроматина и инкорпорированных в него бусовидных структур конденсированного хроматина. Очевидно, что такая картина возникает в результате наложения изображений хромосомоподобных бусовидных структур, которые находились на периферии ядра в его апикальном ракурсе. В связи с обилием структур диф-

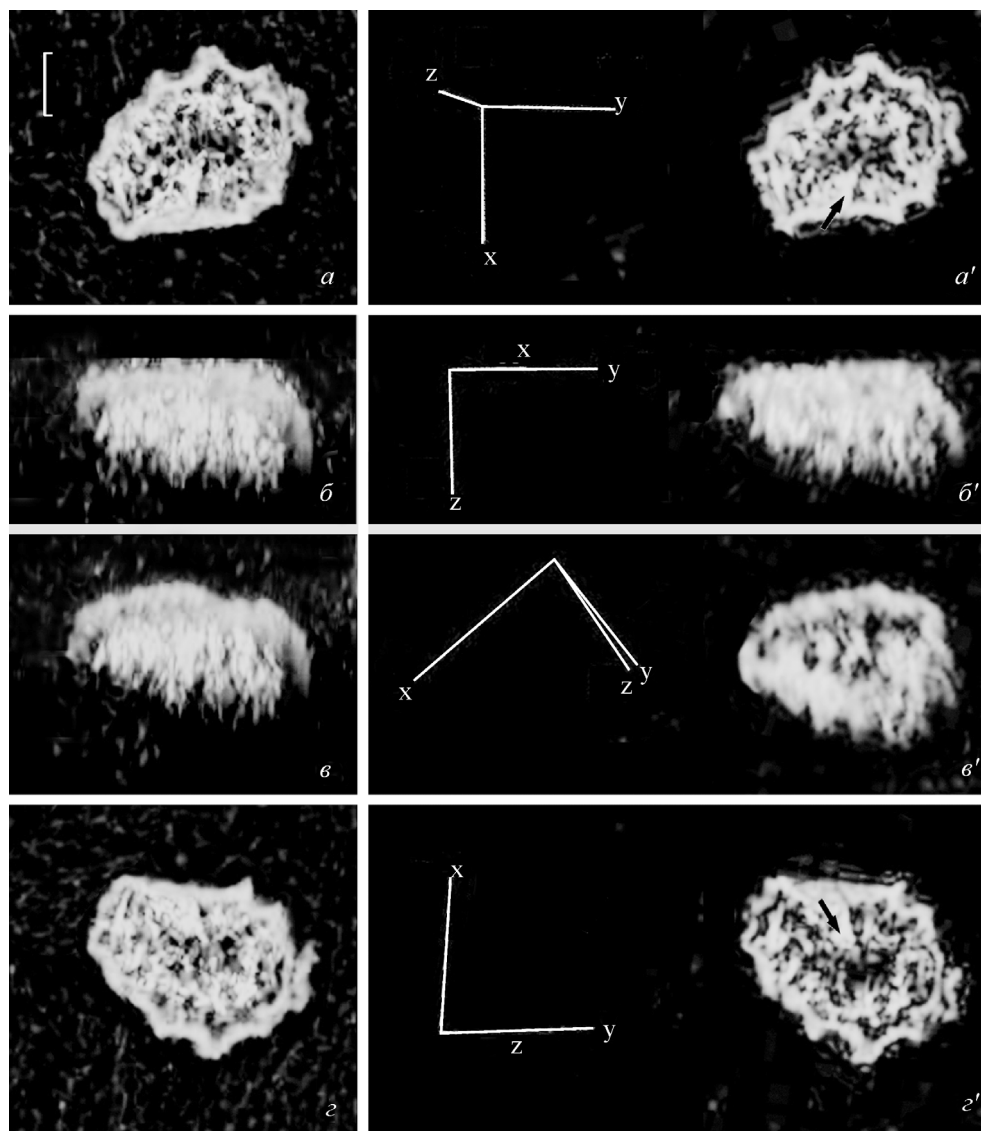


Рис. 1. Организация хроматина в ядре *Amoeba proteus* в профазе митоза с различных ракурсов.

*a—г* — изображения, полученные с помощью встроенного 3D-модуля программы ImageJ; *a'—г'* — изображения, полученные с помощью дополнительного модуля ImageJ 3D Viewer. Стрелки — хромоцентр. Пояснения см. в тексте. Здесь и на рис. 2—6 масштабный отрезок — 10 мкм.

фузного хроматина этот слой лучше виден на реконструкциях, полученных встроенным модулем. Нижний слой — на данном изображении более короткий и толстый — не выглядит сплошным: он состоит из неплотно примыкающих друг к другу бусовидных и нитевидных фибрилл конденсированного хроматина диаметром порядка 0,5—1,0 мкм. Эти структуры по внешнему виду соответствуют хроматиновым компонентам центральной части апикального ракурса ядра.

Оба внутриядерных слоя хроматина непосредственно примыкают друг к другу и не имеют сколько-нибудь заметных участков перекрытия. Площадь ядра на представленном изображении его поперечного ракурса составляет около 700 мкм<sup>2</sup>, при этом приблизительно 350 мкм<sup>2</sup> из них приходится на слой, состоящий из структур конденсированного хроматина.

Ахроматиновые домены, зарегистрированные нами на изображении апикального ракурса профазного ядра, не разрешаются на изображениях поперечного и тангенциально-поперечного ракурсов, полученных с помощью

встроенного 3D-модуля. Такую возможность, однако, дает ImageJ 3D Viewer, поскольку он в отличие встроенного модуля не имеет ограничений в выборе точки обзора ядра. На полученном с его помощью изображении XZ-ракурса ядра (рис. 1, в') хорошо видно, что периферический ахроматиновый домен начинается ниже слоя диффузного хроматина и заходит глубоко внутрь слоя конденсированного хроматина.

Архитектура хроматиновых структур на изображениях базального ракурса ядра (рис. 1, г, г') в основном зеркально симметрично совпадает с таковой на изображениях апикального ракурса (рис. 1, а, а'). Вместе с тем есть и некоторые различия. Базальный ракурс ядра на реконструкциях, выполненных ImageJ 3D Viewer, содержит небольшую отчетливую зону плотно конденсированного хроматина, или хромоцентр, который несколько хуже разрешается на изображениях апикального ракурса (рис. 1, а', г', стрелки). Хромоцентр состоит из тесно прилегающих друг к другу палочковидных фибрилл конденсированного хроматина диаметром порядка 1,0—1,5 мкм.

Клеточное ядро в прометафазе, как и в профазе, содержит выступы, которые хорошо видны со стороны плоской поверхности ядра (рис. 2, а, в). На периферии ядра располагается хромоцентр, состоящий из нескольких субдоменов (рис. 2, г, стрелка). Сплошной слой диффузного хроматина в прометафазном ядре не выявляется. На изображениях поперечного ракурса ядра (особенно в плоскости YZ, рис. 2, б) хорошо видно, что все прометафазное ядро по структуре хроматина соответствует слою конденсированного хроматина, выявляемому в профазном ядре. Такая картина внутриядерной организации может возникать, например, вследствие элиминации в конце профазы слоя разрыхленного хроматина. Это приводит к некоторому уменьшению размеров ядра: площадь всего прометафазного ядра на изображении его поперечного ракурса в плоскости XZ (рис. 2, г) составляет около 320 мкм<sup>2</sup>, что практически соответствует площади слоя, состоящего из структур конденсированного хроматина в профазе (350 мкм<sup>2</sup>).

Площадь ахроматинового домена в центральной части прометафазного ядра заметно больше, чем в профазе, что, скорее всего, обусловлено процессом митотической конденсации хромосом, а также может быть связано с конгрессией (схождением) хромосом в метафазную пластинку. Перемещение хромосом не сопровождается появлением Λ- и крюкообразных фибрилл конденсированного хроматина, что свидетельствует об отсутствии локального кинетохора, по крайней мере у большей части хромосом. Не исключено, что многие, если не все, хромосомы в наборе *A. proteus* голоцентрические. Такие хромосомы, как известно, могут взаимодействовать с нитями веретена деления одновременно в нескольких точках (Melters et al., 2012; Bureš et al., 2013).

Архитектура хроматина в ядре *A. proteus* в мета- и ана-телофазе митоза представлена на рис. 3. В период

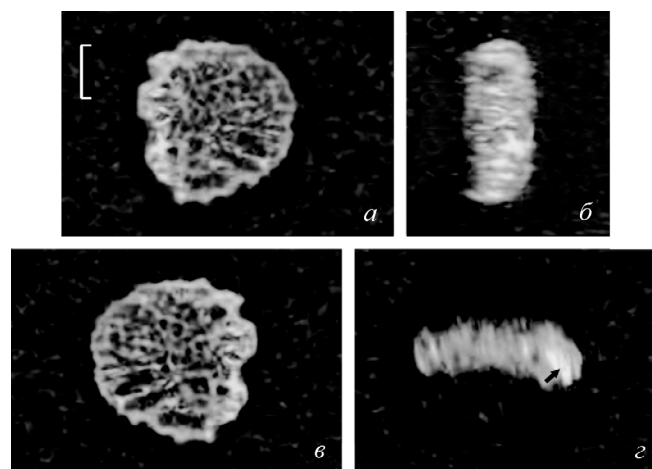


Рис. 2. Организация хроматина в ядре *Amoeba proteus* в прометафазе с различных ракурсов (а—г).

Стрелка — хромоцентр. Пояснения см. в тексте.

максимальной конденсации хроматина в ранней метафазе ядро сильно уплощается. Площадь ядра в поперечном ракурсе (рис. 3, в) по сравнению с прометафазой снижается в 2.7 раза (120 и 320 мкм<sup>2</sup> соответственно). Площадь плоской поверхности метафазного ядра составляет около 300 мкм<sup>2</sup>, что почти в 2.5 раза меньше, чем в профазе. Диаметр округлой метафазной пластинки составляет приблизительно 16—17 мкм. Распределение хромосом в метафазной пластинке неоднородное (рис. 3, а, б, г, д). Большая их часть, в том числе все длинные хромосомы, сосредоточены на периферии ядра. Внутри пластинки просматриваются редко лежащие мини-фокусы

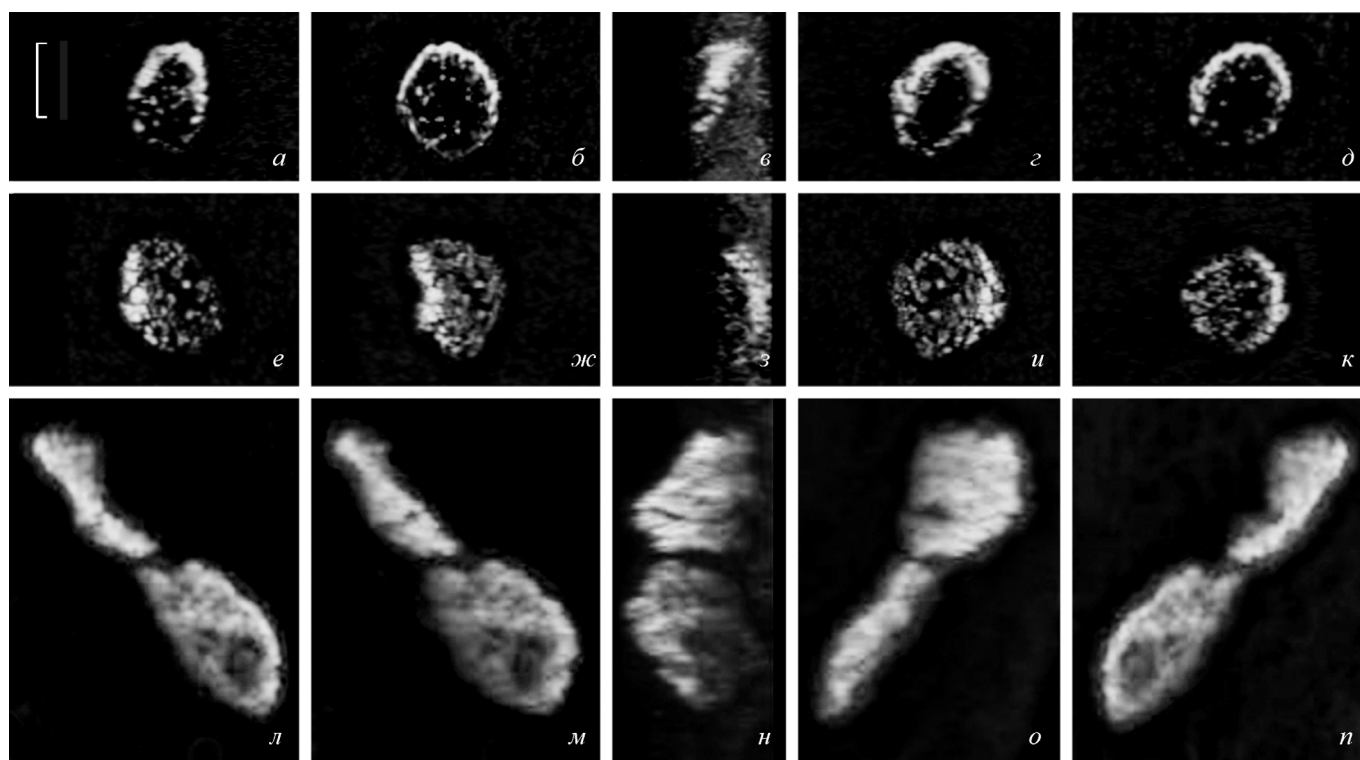


Рис. 3. Организация хроматина в ядрах *Amoeba proteus* в мета- и ана-телофазе с различных ракурсов.

а—д — ранняя метафаза, е—к — поздняя метафаза, л—п — ана-телофаза. Пояснения см. в тексте.

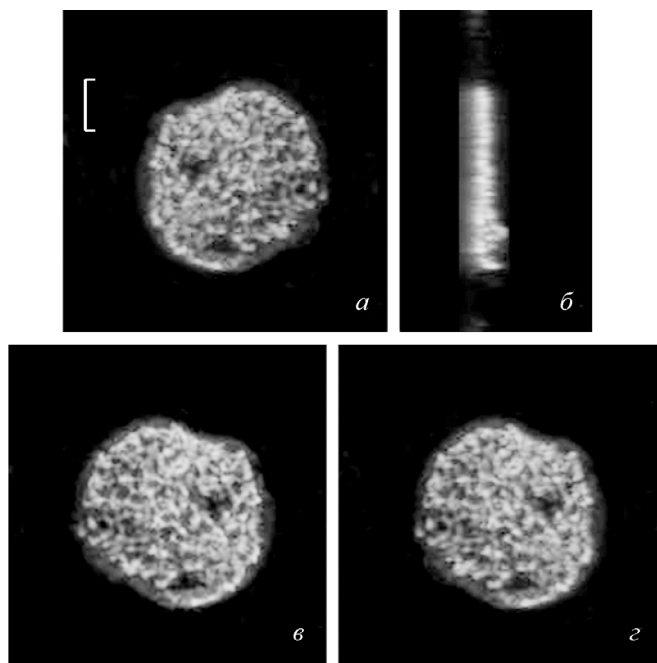


Рис. 4. Организация хроматина в постмитотическом ядре *Amoeba proteus*.

*a, в, г* — апикальный, поперечно-базальный и базальный ракурсы соответственно, *б* — поперечный ракурс. Пояснения см. в тексте.

DAPI-флуоресценции, которые, возможно, представляют собой мелкие хромосомы набора. Число таких фокусов не превышает полутора-двух десятков. Ахроматиновый домен на этой стадии в рассматриваемых ракурсах занимает не менее 70 % площади ядра. На изображении поперечного ракурса метафазного ядра видно, что часть тесно контактирующих хромосом ориентирована поперек ядра (рис. 3, *в*), тогда как остальные, судя по всему, ориентированы в плоскости метафазной пластинки или под небольшим углом к ней.

В поздней метафазе (рис. 3, *е–к*) практически все хромосомы набора оказываются ориентированными в плоскости пластинки. Хромосомы более равномерно распределяются по всей плоскости метафазной пластинки, за исключением ее центральной зоны, в которой сохраняется относительно небольшой ахроматиновый домен. На этой стадии митоза некоторая часть периферических хромосом набора локально деконденсируется, приобретая бусовидную структуру. Локальная деконденсация хроматина приводит к незначительному увеличению размеров позднеметафазного ядра в продольном и поперечном направлениях по сравнению с раннеметафазным. Хромосомы в поздней метафазе заметно отличаются друг от друга по размерам и рисунку хромомеров, которые в свою очередь также могут различаться между собой по диаметру и уровню DAPI-флуоресценции. Однако разброс индивидуальных хромосом в пластинке, видимый на полученных нами изображениях, недостаточен для их точного подсчета. Тем не менее можно сказать, что по максимальным оценкам их никак не более 50–70.

Ориентация хромосом в плоскости пластинки, а также сильно уплощенная форма ядер в последующих фазах (ана- и тело-) митоза (рис. 3, *л–п*) указывают на вероятный механизм обособления дочерних наборов хромосом за счет одномоментной сегрегации сестринских хроматид по всей длине хромосом. Как раз такого рода сегрегация

может происходить в случае голоцентрических хромосом. Если принять, что базальная и апикальная поверхности позднеметафазной пластинки асимметричны в отношении контактов хромосом с ядерной оболочкой, то для ее расщепления достаточно однополюсного веретена деления. Как мы уже упоминали выше, именно такая картина одностороннего контакта микротрубочек веретена с метафазной пластинкой была показана ранее на электрограмме метафазного ядра амёб того же штамма *A. proteus* (Gromov, 1985).

Судя по полученным реконструкциям (рис. 3, *л–п*), хроматин в дочерних ана-телофазных ядрах деконденсируется асимметрично: одно ядро содержит заметно больше конденсированного хроматина, чем другое. На изображениях апикального и поперечного ракурсов площадь одного ядра составляет около 500 и 290 мкм<sup>2</sup>, а площадь другого — 520 и 370 мкм<sup>2</sup> соответственно. Процентное увеличение продольных и поперечных размеров дочерних ядер по сравнению с ядрами в поздней метафазе указывает на то, что деконденсация хроматина в ана-телофазе происходит достаточно быстро. На периферии ядер находится отчетливый слой мини-фокусов DAPI-флуоресценции, который, скорее всего, сформирован латеральными петлями хроматина, фиксированными на внутренней поверхности ядерной оболочки. Можно предположить, что именно здесь располагаются сайты первичной транскрипции хроматина во вновь сформированных ядрах.

Формирующиеся дочерние ядра сильно уплощены и располагаются на одной линии, но развернуты почти под прямым углом друг к другу (рис. 3, *л–п*), тандемной ассоциации хромоцентров в них не наблюдается. Это свидетельствует о сильном растягивающем и вращающем моменте, возникающем в ходе сегрегации дочерних наборов хромосом в ана-телофазе митоза.

Уплощенное дочернее постмитотическое ядро по своей внутренней организации весьма сходно с телофазным ядром, однако площадь его проекции в апикальном и базальном ракурсах возрастает почти вдвое (рис. 4). Так, у ядер, представленных на рис. 4 и 3, она составляет порядка 1200 и 500 мкм<sup>2</sup> соответственно. В связи с этим интересно отметить, что, как было показано на клетках многоклеточных животных, при сходной текстуре хроматина и форме ядра увеличение его площади прямо пропорционально содержанию ДНК (Flajšhans et al., 2011). Все сказанное вполне согласуется с существующим представлением о том, что фаза G<sub>1</sub> в митотическом цикле *A. proteus* отсутствует и синтез ДНК начинается сразу после деления (Ord, 1968; Ron, Prescott, 1969; Prescott, 1987; Махлин, 1993).

На изображениях апикального, поперечно-базального и базального ракурсов постмитотического ядра амёбы видно (рис. 4, *а, в, г*), что на периферии ядра, как и в ана-телофазе, присутствует периферический DAPI-позитивный слой со слабым уровнем флуоресценции. Изображение поперечного ракурса (рис. 4, *б*) свидетельствует о том, что диффузный слой и прилегающий к нему слой конденсированного хроматина в этом ракурсе имеют приблизительно одинаковую толщину. Таким образом, практически сразу после митоза происходит восстановление характерной двухслойной организации уплощенного ядра *A. proteus*, как это было описано выше для профазного ядра.

Кроме двух относительно крупных ахроматиновых доменов (около 20 и 15 мкм<sup>2</sup> на изображениях апикально-

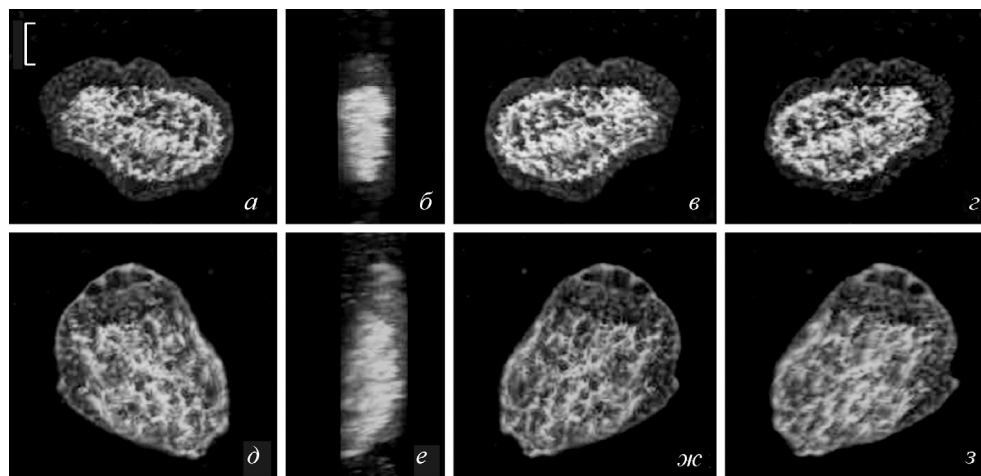


Рис. 5. Организация хроматина в интерфазных ядрах *Amoeba proteus* на раннем (а—г) и позднем (д—з) этапах гиперрепликации ДНК. Пояснения см. в тексте.

го, поперечно-базального и базального ракурсов) в ядре различим еще один, более мелкий ахроматиновый домен (около 3 мкм<sup>2</sup>). Хроматин представлен примыкающими друг к другу относительно короткими бусовидными фибриллами, которые различаются между собой по уровню флуоресценции. Природа периферического диффузного хроматина пока остается неясной. Это могут быть как длинные петли слабо упакованного хроматина, так и относительно короткие последовательности амплифицированной ДНК генов «домашнего хозяйства».

Интерфазное ядро амёбы на изображениях его апикального, поперечно-базального и базального ракурсов (рис. 5, а, в, г) имеет неровные волнистые очертания с выступами, заполненными материалом диффузного хроматина с невысоким уровнем DAPI-флуоресценции. Площадь поверхности ядра, представленного на рис. 5, а, в, г, составляет около 1200 мкм<sup>2</sup>. Площадь его центрального домена, занятого фибриллами компактного хроматина, составляет около 700 мкм<sup>2</sup> (т. е. около 60 % от общей площади ядра). На предыдущей стадии клеточного цикла эти метрики составляли приблизительно 1200 и 970 мкм<sup>2</sup> соответственно (около 82 % от общей площади ядра). Таким образом, переход от постмитотического состояния к следующему этапу интерфазы не дает сколько-нибудь заметного изменения площади всей плоской поверхности ядра, но приводит почти к 40%-ному снижению площади домена конденсированного хроматина в рассматриваемых ракурсах. В то же время площадь проекции ядра и площадь проекции домена конденсированного хроматина в поперечном ракурсе (рис. 5, б) увеличиваются почти на 30 %. Судя по реконструкции поперечного ракурса ядра (рис. 5, б), периферический слой диффузного хроматина охватывает домен конденсированного хроматина со всех сторон, хотя со стороны плоской поверхности ядра он существенно тоньше.

Анализ структуры периферического слоя ядер говорит о том, что он представляет собой рыхлую сеть слабо перекрывающихся между собой бусовидных фибрилл хроматина. Судя по невысокому уровню DAPI-флуоресценции и размерам единичных фибрилл сети, она сформирована относительно небольшим числом длинных слабо компактизированных хромосом. Такая организация характерна для активно транскрибируемых хромосом, на периферии которых следует ожидать повышенной кон-

центрации синтезирующихся и созревающих транскриптов.

Домен конденсированного хроматина на этой стадии не является однородным. Он содержит не менее десятка ахроматиновых зон и значительное число хромосомоподобных фибрилл. На периферии домена и на границе ахроматиновых зон эти фибриллы локально примыкают друг к другу в одной-двух точках. В остальных участках ядра они могут налегать друг на друга и перекрещиваться. Зон слияния этих структур в хромоцентры не наблюдается. Скорее всего, они представляют собой домены индивидуальных хромосом. Точный подсчет числа таких структур в данном случае невозможен, но, по приблизительным прикидкам, их здесь около сотни. В связи со сказанным представляется вполне вероятным, что данное ядро находится на ранних этапах гиперрепликации ДНК, присущей ядерному циклу *A. proteus* (Makhlin et al., 1979; Афонькин, 1983; Махлин, 1987, 1993). В соответствии с нашими данными, наиболее вероятный механизм такой гиперрепликации — эндоредупликация сестринских хроматид с нарушением их когезии по длине хромосомы. Вследствие возникающего десинапсиса спаренных и (или) единичных сестринских хроматид они становятся способными к диссоциации и внутриядерной миграции.

Дальнейшее продвижение ядер по циклу приводит к заметному увеличению их размеров, при том что общая картина их структурной организации в целом сохраняется (рис. 5, д—з). Так, площадь плоской поверхности ядра возрастает почти в 1.5 раза относительно предыдущей стадии цикла (и более чем в 2.5 раза относительно телофазы), соответствующая метрика домена конденсированного хроматина — в 1.4 раза. Площадь ядра в поперечном ракурсе (рис. 5, е) возрастает приблизительно в 1.5 раза, домена конденсированного хроматина — почти в 1.2 раза. Отличительной структурной особенностью такого ядра является ацентричное расположение домена конденсированного хроматина, отчетливо видимое во всех ракурсах (рис. 5, д—з). Конденсированный хроматин сильно разрыхлен. Он содержит хромосомоподобные бусовидные фибриллы, количество которых, по нашим оценкам, в 1.5—2 раза больше, чем в ядрах более ранней стадии цикла. В домене слабо упакованного хроматина заметно различается структура крайней периферии и внутреннего содержимого. На периферии располагаются

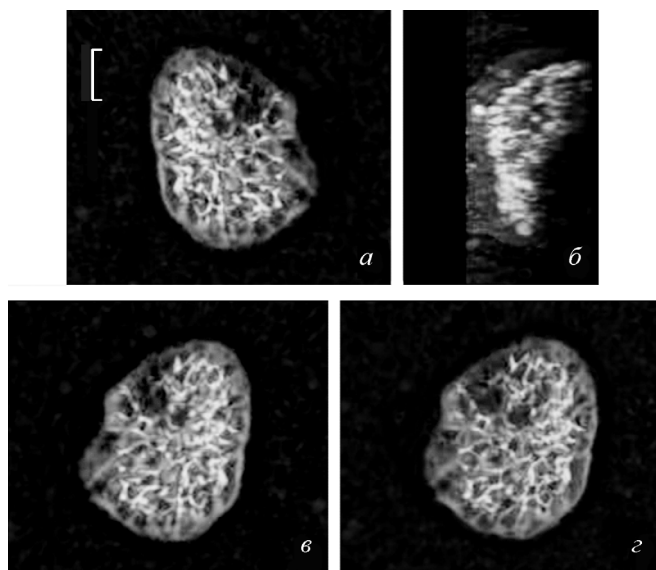


Рис. 6. Организация хроматина в предпрофазном ядре *Amoeba proteus* с различных ракурсов (а—д).

Пояснения см. в тексте.

более яркие и длинные бусовидные фибриллы хроматина, которые формируют сплошной контур. Внутри этого домена находятся разобщенные одиночные, спаренные и строенные бусины хроматина и присутствуют разного размера ахроматиновые зоны.

Не исключено, что уже на этой стадии могут начинаться процессы, связанные с элиминацией какой-то части «избыточного» хроматина. Вместе с тем некоторые из хромосом могут еще только завершать репликацию ДНК в зонах интеркалярного и центрального гетерохроматина (инактивированного хроматина). Недорепликация гетерохроматина, как известно, представляет собой один из механизмов латеральной ассоциации сестринских хроматид при эндоредупликации (Жимулев, 1993). В нашем случае с помощью этого механизма может реализоваться состояние спаренности сестринских хроматид. Судя по высокому содержанию фибрилл слабо упакованного хроматина, уровень транскрипционной активности ядра на этом этапе клеточного цикла может достигать максимально возможных значений.

Предпрофазное ядро (рис. 6) имеет структурную организацию промежуточного типа: по одним архитектурным особенностям оно похоже на ядро на этапе окончания гиперрепликации (предыдущая стадия), по другим — на профазное ядро. По сравнению с предыдущим этапом площадь плоской поверхности ядра в предпрофазе уменьшается в 1.4 раза, а площадь домена конденсированного хроматина уменьшается в 1.5 раза (интересно, что в профазе соответствующая метрика этого домена снова увеличивается в 1.2 раза). Положение домена конденсированного хроматина в предпрофазном ядре становится центральным, что характерно для профазы. Абсолютные значения суммарной площади ахроматиновых доменов на изображениях ядра в апиальном и базальном ракурсах (рис. 6, а, з) практически не изменяется, зато относительное значение для этой метрики — процентное отношение суммарной площади ахроматиновых доменов к площади домена слабо упакованного хроматина — увеличивается в 1.8 раза. На изображении поперечного ракурса (рис. 6, б) предпрофазное ядро имеет почти такую

же площадь, что и ядро на предыдущей фазе цикла. При этом площадь домена конденсированного хроматина увеличивается в 1.3 раза и почти достигает профазного состояния. Вполне возможно, что наблюдаемые структурные изменения в рассматриваемом интервале ядерного цикла могут быть связаны с процессами элиминации «избыточного» хроматина из области домена слабо упакованного хроматина, а также с миграцией части слабо упакованных хромосом в зону конденсированного хроматина, где они подвергаются компактизации.

Таким образом, динамика пространственной организации хроматиновых структур ядра в клеточном цикле *A. proteus*, реконструированная нами и представленная в настоящей работе, а также анализ имеющихся литературных данных позволяют сделать следующие заключения.

В клеточном цикле амёб имеют место двухэтапная интерфаза и митоз особого типа, не соответствующий ни одному из известных типов в существующей классификации митозов (см.: Raikov, 1982). В самом начале интерфазы происходит удвоение содержания ДНК. На этой стадии цикла ядра амёб имеют форму округлой пластинки. В первом цикле редупликации амёбной ДНК нет фазы G<sub>1</sub>, а есть только фазы S и G<sub>2</sub>. Более того, синтез ДНК начинается уже в телофазе, что может быть только при условии неполной конденсации в митозе хроматиновых локусов, в которых располагаются промоторы репликационных, а также генов, активность которых необходима для запуска репликации. Известно, что программируемая «недокомпактизация» хроматина в митозе характерна для процессов генетического букмаркинга, т. е. является одним из механизмов эпигенетического наследования (Michelotti et al., 1997; Zaidi et al., 2011). На присутствии такого рода процессов указывает бусовидная структура хромосом, которая экспрессируется в конце метафазы. Поскольку в собственно метафазе у амёбы регистрируется максимально высокий уровень конденсации хромосом, период метафазной экспрессии «недоконденсированных» локусов хромосом можно обозначить как особую стадию митоза, которую мы бы назвали «проанафазой».

На последующем этапе интерфазы происходит гиперрепликация ДНК, которая приводит к заметному увеличению размеров ядра, некоторым изменениям его формы и появлению отчетливых волн и выступов на его поверхности. Гиперрепликация осуществляется, скорее всего, за счет эндоредупликации хромосом и происходит с нарушением когезии сестринских хроматид. Спаренные и (или) пары единичных асиноптированных сестринских хроматид мигрируют на периферию ядра и формируют слой слабо упакованных фибрилл хроматина.

В профазе митоза происходит значительная редукция периферического слоя слабо упакованного хроматина до кольцевидного образования. Ядерные домены слабо упакованного и конденсированного хроматина примыкают друг к другу и не имеют сколько-нибудь заметных участков перекрытия. Постепенно между ними формируется разделительный ахроматиновый слой. Как показано в настоящей работе, прометафазное ядро как по своей структуре, так и по размерам соответствует домену конденсированного хроматина профазного ядра. Это наводит на мысль о том, что переход на стадию прометафазы может осуществляться посредством отшнуровки от ядра периферического слоя слабо упакованного хроматина, что и является тем самым до сих пор неизвестным механизмом элиминации основной части «избыточной» ДНК в ядерном цикле *A. proteus*.



В ходе прометафазы происходит схождение (конгрессия) хромосом в подковообразную метафазную пластинку. В метафазе завершается митотическая конденсация хромосом. Отсутствие перегибов хромосомных фибрилл при миграции их в плоскость формирующейся метафазной пластинки, а также сегрегация сестринских хроматид в анафазе путем продольного расщепления метафазной пластинки указывают на то, что значительная часть хромосом набора не имеет локального кинетохора. Скорее всего, как уже было сказано выше, они представляют собой голоцентрические хромосомы, способные взаимодействовать с микротрубочками веретена деления сразу в нескольких участках своей поверхности.

Вопрос о числе хромосом в кариотипе *A. proteus* с точки зрения представленной концепции динамики организации ядра у этого вида является неоднозначным. Согласно этой концепции, у амёбы будет определяться разное число хромосом в зависимости от этапа клеточного цикла. Так, по нашим данным, после завершения эндоредупликации в ядре формируется не менее 150—200 относительно коротких нитевидных хромосом, очень похожих на описанные ранее другими исследователями (см.: Марахова и др., 1993). Возможное число раундов эндоредупликации в клеточном цикле вполне может быть больше одного, например два или три. В таких случаях в ядре может быть до 1000 нитевидных фибрилл конденсированного хроматина, что и соответствует традиционным представлениям о числе хромосом у *A. proteus*, которые в течение почти столетия переписываются из одной работы в другую (Ord, 1973; Yudin, 1990; Марахова и др., 1993; Махлин, 1993). Вместе с тем базовое число хромосом, которое можно точно определить только в прометафазе и метафазе митоза, по нашим оценкам, оказывается не более 50—70, что соответствует предварительным данным, полученным нами ранее с помощью других методов (Podlipaeva et al., 2014). Не исключено, что наиболее удобной стадией цикла для кариотипирования является поздняя профазы, где хромосомы базового набора не ассоциируют друг с другом и имеют достаточно высокое разрешение, а элиминирующиеся хромосомы пространственно отделены от основного набора и слиты в сплошную кольцевидную хроматиновую структуру.

Предложенная нами в настоящей работе концепция динамики структурной организации ядра в клеточном цикле *A. proteus* объединяет и непротиворечиво интерпретирует всю совокупность имеющихся данных по этой проблеме. Понятно, что она потребует дальнейшей экспериментальной проверки и уточнений деталей, оставшихся неясными.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-04-03451).

### Список литературы

Афонькин С. Ю. 1983. Содержание ДНК в ядрах разных штаммов *Amoeba proteus* по данным цитофлуориметрии. Цитология. 25 (7) : 771—776. (Afon'kin S. Yu. 1983. The maintenance of DNA in nuclei of different strains of *Amoeba proteus* according to a cytofluorimetry. Tsitologiya. 25 (7) : 771—776.)  
Борисенко И. Е., Подлипаева Ю. И., Гудков А. В. 2010. Нуклеиновые кислоты в интерфазном ядре *Amoeba proteus*: конфокально-микроскопическое исследование. Цитология. 52 (8) : 647. (Borisenko I. E., Podlipaeva Yu. I., Goodkov A. V. 2010.

Nucleic acids in the interphase nucleus of *Amoeba proteus*: confocal-microscopic study. Tsitologiya. 52 (8) : 647.)

Жимулев И. Ф. 1993. Гетерохроматин и эффект положения гена. Новосибирск: Наука. 491 с. (Zhimulev I. F. 1993. Heterochromatin and gene position effect. Novosibirsk: Nauka. 491 p.)

Марахова Н. В., Сопина В. А., Скарлато С. О., Громов Д. Б. 1993. Выявление молекул ДНК хромосомного размера у *Amoeba proteus* методом электрофореза в пульсирующем поле. Докл. РАН. 330 (6) : 794—796. (Marakhova N. V., Sopina V. A., Skarlato S. O., Gromov D. B. 1993. Separation of chromosome-sized DNA from *Amoeba proteus* by transverse alternating-field electrophoresis. Doklady RAS. 330 (6) : 794—796.)

Махлин Е. Е. 1987. Вариабельность количества ДНК, синтезируемой в ядрах амёб *Amoeba proteus*, в клеточном цикле. Цитология. 29 (12) : 1379—1384. (Makhlin E. E. 1987. Variability of DNA quantity synthesized in *Amoeba proteus* nuclei during the cell cycle. Tsitologiya. 29 (12) : 1379—1384.)

Махлин Е. Е. 1993. Синтез избыточной ДНК в ядрах амёб *Amoeba proteus* в клеточном цикле. Цитология. 35 (3) : 109—121. (Makhlin E. E. 1993. The extra DNA synthesis in *Amoeba proteus* nuclei during the cell cycle. Tsitologiya. 35 (3) : 109—121.)

Юдин А. Л. 1975. Амёба. В кн.: Объекты биологии развития. М. : Наука. 5—12. (Yudin A. L. 1975. Amoeba. In: Objects of developmental biology. Moscow: Nauka. 5—12.)

Юдин А. Л. 1982. Ядерно-цитоплазматические взаимодействия и клеточная наследственность у амёб. Л. : Наука. 200 с. (Yudin A. L. 1982. Nucleocytoplasmic relationships and cell heredity in amoebae. Leningrad: Nauka. 200 p.)

Афон'кин С. Ю. 1989. Induced and spontaneous polyploidization in large amoebae. Int. Rev. Cytol. 115 : 231—266.

Bureš P., Zedek F., Marková M. 2013. Holocentric chromosomes. In: Plant genome diversity. Wien: Springer Verlag. 2 : 187—208.

Daniels E. W. 1973. Ultrastructure. In: The biology of amoeba. New York: Acad. Press. 125—169.

Demin S., Pleskach N., Svetlova M., Solovjeva L. 2011. High-resolution mapping of interstitial telomeric repeats in Syrian hamster metaphase chromosomes. Cytogenet. Genome Res. 132 : 151—155.

Flajshans M., Pšenička M., Rodina M., Těšitel J. 2011. Image cytometric measurements of diploid, triploid and tetraploid fish erythrocytes in blood smears reflect the true dimensions of live cells. Cell Biol. Int. 35 : 67—71.

Flickinger C. J. 1974. The fine structure of four 'species' of *Amoeba*. J. Protozool. 21 : 59—68.

Goldstein L., Ko Ch. 1978. Identification of the small nuclear RNAs associated with the mitotic chromosomes of *Amoeba proteus*. Chromosoma (Berl.). 68 : 516—525.

Goodkov A. V., Yudin A. L., Podlipaeva Yu. I. 2014. Collection of the proteus-type amoebae at the Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences. I. History, goals and research field. Protistology. 8 : 71—75.

Gromov D. B. 1985. Ultrastructure of mitosis in *Amoeba proteus*. Protoplasma. 126 : 130—139.

Hulsebos T. J., Hackstein J. H., Hennig W. 1984. Lampbrush loop-specific protein of *Drosophila hydei*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 81 : 3404—3408.

Jeon K. W. (ed.). 1973. The biology of amoeba. New York: Acad. Press. 628 p.

Jeon K. W. 1995. The large, free-living amoebae: wonderful cells for biological studies. J. Eukar. Microbiol. 42 : 1—7.

Liesche W. 1938. Die Kern- und Fortpflanzungsverhältnisse von *Amoeba proteus* (Pall.). Arch. Protistenk. 91 : 135—186.

Makhlin E. E., Kudryavtseva M. V., Kudryavtsev B. N. 1979. Peculiarities of changes in DNA content of *Amoeba proteus* nuclei during interphase. Exp. Cell Res. 118 : 143—150.

Melters D. P., Paliulis L. V., Korf I. F., Chan S. W. 2012. Holocentric chromosomes: convergent evolution, meiotic adaptations, and genomic analysis. Chromosome Res. 20 : 579—593.

Michelotti E. F., Sanford S., Levens D. 1997. Marking of active genes on mitotic chromosomes. Nature. 388 : 895—899.

- Ord M. J. 1968. The synthesis of DNA through the cell cycle of *Amoeba proteus*. J. Cell Sci. 3 : 483—491.
- Ord M. J. 1971. The initiation, maintenance and termination of DNA synthesis: a study of nuclear DNA replication using *Amoeba proteus* as a cell model. J. Cell Sci. 9 : 1—21.
- Ord M. J. 1973. Chemical mutagenesis. In: The biology of amoeba. New York: Acad. Press. 349—370.
- Ord M. J. 1979. The separate roles of nucleus and cytoplasm in the synthesis of DNA. Int. Rev. Cytol. Suppl. 9 : 221—277.
- Page F. C. 1986. The genera and possible relationships of the family Amoebidae, with special attention to comparative ultrastructure. Protistologica. 22 : 301—316.
- Podlipaeva Yu., Demin S., Goodkov A. 2013. New method for cell cycle synchronization in *Amoeba proteus* culture. Protistology. 8 : 3—7.
- Podlipaeva Yu., Demin S., Skarlato S., Yudin A., Berdieva M., Goodkov A. 2014. New promising approach to karyotype determination in *Amoeba proteus*. Mol. Biol. Cell. 25 : Meeting Abstract P1973.
- Prescott D. M. 1987. Cell reproduction. Int. Rev. Cytol. 100 : 93—128.
- Prescott D. M., Carrier R. F. 1964. Experimental procedures and cultural methods for *Euplotes eurystomus* and *Amoeba proteus*. In: Methods in cell physiology. New York; London: Acad. Press. 1 : 85—95.
- Raikov I. B. 1982. The protozoan nucleus. Morphology and evolution. Wien: Springer. 474 p.
- Ron A., Prescott D. M. 1969. The timing of DNA synthesis in *A. proteus*. Exp. Cell Res. 56 : 430—434.
- Roth L. E. 1967. Electron microscopy of mitosis in amoebae. III. Cold and urea treatments: a basis for tests of direct effects of mitotic inhibitors on microtubule formation. J. Cell Biol. 34 : 47—59.
- Roth L. E., Obetz S. W., Daniels E. W. 1960. Electron microscopic studies of mitosis in amoebae. I. *Amoeba proteus*. J. Biophys. Biochem. Cytol. 8 : 207—220.
- Spear B. B., Prescott D. M. 1980. Nuclear DNA in normal and refeed *Amoeba proteus*. Exp. Cell Res. 130 : 387—392.
- Yudin A. L. 1990. *Amoeba* and other protozoa. In: Animal species for developmental studies. Invertebrates. New York; London: Consultants Bureau. 1 : 1—11.
- Zaidi S. K., Young D. W., Montecino M., van Wijnen A. J., Stein J. L., Lian J. B., Stein G. S. 2011. Bookmarking the genome: maintenance of epigenomic information. J. Biol. Chem. 286 : 18 355—18 361.

Поступила 24 VIII 2015

#### CHROMATIN ORGANIZATION IN CELL CYCLE OF *AMOEBA PROTEUS* ACCORDING TO OPTICAL TOMOGRAPHY DATA

S. Yu. Demin, M. A. Berdieva, Yu. I. Podlipaeva, A. L. Yudin, A. V. Goodkov<sup>1</sup>

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;  
<sup>1</sup> e-mail: pelgoodl@gmail.com

For the first time the nuclear cycle of large freshwater amoeba *Amoeba proteus* was studied by the method of optical tomography. The nuclei were fixed *in situ* in the cells of synchronized culture, stained by DAPI and examined by confocal laser scanning microscope. 3D-images of intranuclear chromatin were studied in details at different stages of nuclear cycle. The obtained data, together with literary ones allow represent the dynamics of structural organization of the nucleus in *Amoeba proteus* cell cycle in a new fashion. It was concluded that in this species the two-stage interphase takes place, as well as mitosis of peculiar type which does not correspond to any known type of mitosis according to classification existing now. It is presumed that in the course of nuclear cycle the chromosomes and/or their fragments are amplified, this presumption being in a good correspondence with the data about nuclear DNA hyperreplication in the cell cycle of *A. proteus*. As a result of chromosomes amplification their number may vary at different stages of cell cycle, and it allows to explain the contradictory data concerning the exact number of chromosomes in this species. The elimination of extra-DNA occurs mainly at the stage between prophase and prometaphase. We presume the majority of chromosomes, or may be even all of them to be referred to cholo-centric type according to their behaviour during the mitosis.

Key words: *Amoeba proteus*, nuclear cycle, confocal microscopy, optical tomography, chromatin organization.