ФОРМИРОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО КИНЕТОХОРА В СИСТЕМЕ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ЭКСТРАКТОВ ООЦИТОВ *XENOPUS LAEVIS* ТРЕБУЕТ ПРОХОЖДЕНИЯ ДНК СПЕРМИЯ ЧЕРЕЗ ИНТЕРФАЗУ

© Е. Ю. Боярчук,^{1,2} Н. Н. Никольский,¹ М. Дассо,² А. М. Арнаутов^{2,*}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия и ² Национальные институты здравоохранения, Бетезда, США; * электронный адрес: arnaouta@mail.nih.gov

Цитоплазматические экстракты ооцитов Xenopus laevis являются широко используемой системой для изучения процессов формирования и функционирования хроматина. Существуют два метода получения митотических хромосом с использованием системы экстрактов. При использовании первого метода хромосомы получат из нереплицированных ядер спермиев непосредственно в мейотических экстрактах ооцитов. Второй метод включает в себя стадию репликации ДНК спермия перед инициацией митоза. В настоящей работе мы показали, что структура кинетохора оказывается нарушена при формировании хромосом из ядер спермиев непосредственно в мейотических экстрактах. Количество связанных с хроматином белков наружного кинетохора Bubl, BubR1 и субъединицы динактина p150glued было снижено, а компоненты внутреннего центромерного домена (киназа Aurora B и белок Survivin) перераспределялись с кинетохоров на плечи хромосом. Напротив, кинетохоры хромосом, сформированных с использованием второго метода, были чрезвычайно близки по структуре к кинетохорам соматических клеток. Напии результаты указывают на то, что прохождение ДНК спермия через интерфазу является необходимым шагом для формирования функционального кинетохора.

Ключевые слова: Xenopus laevis, цитоплазматические экстракты, хромосомы, кинетохор.

Для осуществления правильной сегрегации хромосом между дочерними клетками в ходе митоза сестринские хроматиды должны быть присоединены к микротрубочкам, растущим с противоположных полюсов митотического веретена. Хромосомы присоединяются к митотическому веретену при помощи многокомпонентной белковой структуры — кинетохора. Кинетохор формируется на центромерном участке каждой сестринской хроматиды и может быть условно разделен на 2 субдомена — внутренний центромерный домен (ВЦД) и наружный кинетохор (НК) (Cleveland et al., 2003; Chan et al., 2005; Meraldi et al., 2006). Наружный кинетохор выявляется на электронных микрофотографиях в виде многослойной электронно-плотной структуры. Компоненты наружного кинетохора участвуют в непосредственном присоединении микротрубочек к хроматину и генерировании сигнала, блокирующего начало выхода из митоза до тех пор, пока все хромосомы не будут присоединены к митотическому веретену. Внутренний центромерный домен состоит из белков, вовлеченных в регуляцию присоединения микротрубочек и удержания вместе сестринских хроматид до наступления анафазы (Chen, 2002; Cleveland et al., 2003; Maiato et al., 2004; Rivera, Losada, 2006

Одной из наиболее распространенных модельных систем для изучения процесса формирования кинетохора и его функционирования являются цитоплазматические экстракты из зрелых ооцитов шпорцевой лягушки Хепориз laevis. Эта система позволяет воспроизвести in vitro процессы репликации, конденсации и сегрегации хромосом (De la Barre et al., 1999; Maresca, Heald, 2006a; Tutter, Walter, 2006). Зрелые ооциты лягушки остановлены на стадии метафазы мейоза II действием цитостатического фактора (ЦСФ). Добавление ядер спермиев, содержащих нереплицированную ДНК, к цитоплазматической фракции ооцитов (ЦСФ-экстракты) приводит к сборке митотических хромосом, называемых ЦСФ-хромосомами. Такие ЦСФ-хромосомы широко используются для изучения процессов формирования митотических хромосом, сборки и функционирования кинетохора, активации сигнальных путей контрольной точки сборки веретена деления и др. (Smythe, Newport, 1991; Desai et al., 1999).

Другой метод получения митотических хромосом с использованием цитоплазматических экстрактов ооцитов X. laevis включает в себя стадию репликации ДНК спермиев. In vivo проникновение спермия вызывает выброс ионов кальция из внутренних компартментов ооцита. Повышение цитоплазматической концентрации Ca²⁺ приводит к инактивации цитостатического фактора и выходу ооцита из мейоза в интерфазу. Добавление в ЦСФэкстракты CaCl₂ имитирует выброс ионов кальция и инактивирует ЦСФ, причем экстракты переходят из митоза в интерфазу. Добавление спермиев в такие экстракты приводит к формированию интерфазных ядер с последующей репликацией их ДНК. После окончания репликации в таких экстрактах можно инициировать митоз, добавив 2/3 объема ЦСФ-экстрактов. Переход из интерфазы в митоз приводит к формированию реплицированных митотических хромосом (М-хромосом).

Вопрос о физиологичности хромосом, сформированных непосредственно в ЦСФ-экстракте, остается спорным. Несмотря на некоторое сходство между ЦСФхромосомами X. laevis и митотическими хромосомами соматических клеток, существуют доказательства того, что ЦСФ-хромосомы непригодны для изучения организации кинетохора и хромосом. Так, было показано, что для конденсации ЦСФ-хромосом не требуется накопления на них линкерного гистона H1 (Ohsumi et al., 1993). В то же время отсутствие H1 в экстрактах при формировании М-хромосом приводит к их значительному удлинению (Maresca et al., 2005). Кроме того, исследования с использованием электронной микроскопии показали, что морфология кинетохоров, сформированных на ЦСФ-хромосомах, отличается от морфологии кинетохоров, сформированных на M-хромосомах (Sawin, Mitchison, 1991). В дальнейшем было показано, что количество одного из компонентов наружного кинетохора — белка Ndc80 — снижено в ЦСФ-хромосомах по сравнению с M-хромосомами (Maresca, Heald, 2006b).

Целью настоящей работы было сравнение строения кинетохоров, сформированных на ЦСФ- и М-хромосомах, а также оценка возможности использования хромосом, сформированных в цитоплазматических экстрактах ооцитов X. laevis, в качестве модели для изучения формирования кинетохоров позвоночных с применением биохимических методов.

Материал и методика

Антитела. В настоящей работе были использованы антитела против следующих белков: Topoisomerase II (Azuma et al., 2003), p150glued (Beckman Dickens, CIIIA), Survivin (R&D, США), диметилированная форма гистона H3 (Lys9), фосфорилированная форма гистона H3 (Upstate Biotechnology, США), X. laevis Dasra A (любезно предоставлены д-ром Х. Фунабики, Университет Рокфеллера, Нью-Йорк, США), Smc2 (любезно предоставлены д-ром А. Струнниковым, Национальные институты здравоохранения, Бетезда, США). Поликлональные антитела против X. laevis Bub1 (аминокислоты 274-467), X. laevis Aurora B, Scc1 (пептид: EPYSDIIATPGPRFH), X. laevis BubR1 (аминокислоты 189—359), X. laevis Sgo (аминокислоты 1-663) были получены при иммунизации кроликов или куриц и аффинно очищены. Все вторые антитела, сконъюгированные с красителями Alexa Fluor (488, 568 или 647), были приобретены в фирме Моlecular Probes Inc. (CIIIA).

Приготовление цитоплазматических экстрактов из ооцитов Xenopus laevis. Ядра спермиев X. laevis и цитоплазматические экстракты зрелых ооцитов, остановленных в мейозе под действием ЦСФ, готовили, как было описано ранее (Kornbluth, 2001). Выход в интерфазу индуцировали добавлением в ЦСФ-экстракты CaCl₂ в конечной концентрации 0.06 мМ. Ядра спермиев добавляли в конечной концентрации 1000—4000 ядер на 1 мкл экстракта. После окончания репликации ДНК индуцировали переход в митоз, добавляя 2/3 объема ЦСФ-экстрактов. Нокодазол (Sigma, США) добавляли вместе с ЦСФ-экстрактами в конечной концентрации 20 мкг/мл. Иммуноистощение. Для иммуноистощения магнитные частицы, сконъюгированные с белком-А (Dynal Co, США), инкубировали в течение 16 ч при 4 °С с антителами против Bub1 или с контрольными IgG из сыворотки крови кроликов (Vector, США), а затем ковалентно связывали, используя диметил пимелимидат · 2 HCl (Dimethyl pimelimidate · 2HCl, Pierce, США) по протоколу фирмы-производителя. Частицы инкубировали в 10%-ном растворе гидролизованного желатина (Sigma, США) в буфере CSF-XB (10 мМ HEPES-KOH, pH 7.7, 100 мМ KCl, 2 мМ MgCl₂ и 5 мМ EGTA) в течение 20 мин, промывали буфером CSF-XB и инкубировали 1 ч с экстрактами при 23 или 4 °С. Магнитные частицы с образовавшимися иммунными комплексами удаляли из экстракта сильным магнитом.

Очистка хроматина. 100 мкл каждой реакции разбавляли в 5 раз 0.8-кратным буфером CSF-XB, содержащим 20 мМ β-глицерофосфата, 5 % глицерина и 0.5% Тритона Х-100, инкубировали при комнатной температуре в течение 1 мин, наслаивали на подушку, содержащую буфер CSF-XB и 35 % глицерина, и центрифугировали при 10 000 g в течение 5 мин при 4 °C. Осадок пипетировали в том же буфере, наслаивали на подушку и центрифугировали при тех же условиях. К осадкам добавляли 60 мкл буфера Лэммли и кипятили в течение 5 мин. Для иммунофлуоресцентного анализа 30 мкл каждой реакции разбавляли в 10 раз 0.8-кратным буфером CSF-XB, содержащим 250 мМ сахарозы. Хромосомы фиксировали, добавляя равный объем того же буфера, содержащего 4 % параформальдегида. Через 30 мин фиксации при комнатной температуре хромосомы осаждали на покровные стекла центрифугированием через подушку, содержащую 40 % глицерина.

Иммунофлуоресценция и анализ изображений. Осажденный на стекла хроматин инкубировали в течение 40 мин в 3%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина, окрашивали соответствующими первичными антителами в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем вторыми антителами в течение 40 мин. ДНК окрашивали красителем Hoechst 33342 (4 мкг/мл). Образцы анализировали при помощи микроскопа Axioskop, используя объектив Iris $100 \times /1.4$ или $40 \times /1.3$ (Carl Zeiss MicroImaging, Inc.). Изображения снимали камерой Orca II; Hamamatsu Photonics K. K.). Управление системой осуществляли программным обеспечением Openlab Software (Improvision, США). Масштабная линейка на рисунках соответствует 20 мкм (кроме специально отмеченных случаев).

Результаты

Формирование кинетохоров нарушено на ЦСФ-хромосомах. Попадая в ЦСФ-экстракты, ядра спермиев способны сформировать конденсированный митотический хроматин (Sawin, Mitchison, 1991). Для того чтобы определить, является ли такой хроматин адекватной моделью для изучения процесса сборки кинетохора и его функционирования, мы сравнили количество некоторых белков кинетохора в ЦСФ- и М-хромосомах. Для формирования митотического хроматина в ЦСФ-экстрактах в цитоплазматическую фракцию ооцитов добавляли 4000 ядер спермиев на 1 мкл и инкубировали в присутствии нокодазола в течение 2 ч при 23 °С. Для получения М-хромосом в ЦСФ-экстрактах индуци-



Рис. 1. Кинетохоры, сформированные на ЦСФ-хромосомах, имеют нарушенную структуру.

а — схема эксперимента; для получения ЦСФ-хромосом в ЦСФ-экстракты добавляли ДНК спермиев в конечной концентрации 4000 ядер спермиев на 1 мкл экстракта и нокодазол в конечной концентрации 20 мкг/мл; хромосомы очищали через 2 ч инкубации при 23 °C; для получения М-хромосом в ЦСФ-экстрактах индуцировали интерфазу добавлением 0.06 мМ CaCl₂, а затем к таким экстрактам добавляли ядра спермиев в конечной концентрации 2000 спермиев на 1 мкл экстракта; через 1 ч в экстрактах индуцировали переход из интерфазы в митоз, добавляя 2/3 объема ЦСФ-экстрактов; хромосомы очищали через 1 ч после инициации митоза. б — очищенные ЦСФ- и М-хромосомы анализировали методом Вестерн-блотинга с антителами против указанных белков. в — ЦСФ- и М-хромосомы анализировали методом непрямой иммунофлуоресценции с окраской антителами против белков Аигога B, Survivin (зеленый) и Bub1(красный). ДНК окрашивали красителем Hoechst 33342. ровали переход из мейоза в интерфазу, добавляя 0.06 мМ CaCl₂, и к полученным интерфазным экстрактам добавляли 2000 ядер спермиев на 1 мкл экстракта. После окончания репликации ДНК индуцировали митоз, добавляя 2/3 объема ЦСФ-экстракта (рис. 1, а). Количество структурных компонентов (гистонов H2A/H2B) и фосфорилированной формы гистона H3 было идентично в обоих типах хромосом (рис. 1, б). Субъединица комплекса когезина Scc1 предпочтительнее связывалась с реплицированным хроматином, что согласуется с предшествующими исследованиями (Losada et al., 1998). Количество некоторых белков внутреннего центромерного домена кинетохора, например белка Shugoshin (xSgo), было близким в ЦСФ- и М-хромосомах. В то же время уровень других компонентов ВЦД — белков Aurora В и Dasra A — был несколько снижен на ЦСФ-хромосомах (рис. 1, б; 2, а). Иммунофлуоресцентный анализ ЦСФ- и М-хромосом показал, что компоненты транзитного хромосомного комплекса (ТХК, Chromosomal Passenger Complex) Aurora В и Survivin расположены исключительно в ВЦД М-хромосом, в то время как в ЦСФ-хромосомах они распределены по всему хроматину (рис. 1, e). Мы также обнаружили, что уровень белков наружного кинетохора, связанных с хроматином (Bub1, BubR1 и р150glued), значительно снижен в ЦСФ-хромосомах по сравнению с М-хромосомами (рис. 1, 6; 2, a).

Для более детального анализа различий между кинетохорами ЦСФ- и М-хромосом мы воспользовались биохимическим анализом строения кинетохора. Ранее было показано, что белок Bub1 абсолютно необходим для сборки наружного кинетохора в ЦСФ-хромосомах (Sharp-Baker, Chen, 2001; Vigneron et al., 2004). В то же время в соматических клетках, лишенных эндогенного Bub1, наружный кинетохор формируется, хотя и менее эффективно (Johnson et al., 2004). Мы подтвердили, что сборка наружного кинетохора в экстрактах, лишенных эндогенного Bub1, полностью нарушена в ЦСФ-хромосомах: такие кинетохоры не содержали ни BubR1, ни р150glued (рис. 2). В противоположность ЦСФ-хромосомам отсутствие Bub1 в экстрактах при формировании М-хромосом приводило лишь к частичному уменьшению количества белков BubR1 и p150glued, связанных с хроматином (рис. 2), но не блокировало формирование наружного кинетохора полностью.

Таким образом, кинетохоры ЦСФ-хромосом имеют пониженный уровень белков наружного кинетохора и внутреннего центромерного домена, а процесс формирования наружного кинетохора на ЦСФ-хромосомах в большей степени зависит от присутствия белка Bub1, чем формирование кинетохора на М-хромосомах. Более того, локализация некоторых компонентов ВЦД в ЦСФ-хромосомах нарушена. Исходя из этих данных мы заключили, что организация кинетохоров ЦСФ-хромосом является аберрантной. В противоположность кинетохорам ЦСФ-хромосом строение кинетохоров М-хромосом X. laevis имеет сходство со строением кинетохоров соматических клеток, что указывает на то, что ЦСФ-хромосомы представляют собой физиологически оптимальную систему для изучения структуры и функции кинетохора.

Формирование функционального кинетохора не требует репликации ДНК. Наши результаты позволяют предположить, что на формирование функционального кинетохора влияют некие процессы, происходящие в интерфазе. Одним из таких процессов,

приводящих к разнице в строении кинетохоров ЦСФ- и М-хромосом, может являться репликация ДНК. Для проверки роли репликации ДНК в формировании кинетохора в момент инициации интерфазы в экстракты добавляли ингибитор ДНК-полимеразы I афидиколин. Через 1 ч инкубации ядер спермиев в таких экстрактах был индуцирован митоз. Обнаружено, что присутствие афидиколина не нарушает сборку кинетохора: уровень белков Bub1, BubR1, и p150glued на хроматине был сходным в контрольных и обработанных афидиколином образцах (рис. 3, δ). В качестве дополнительного теста была проанализирована чувствительность процесса сборки наружного кинетохора к истощению афинными антителами из экстракта белка Bub1. Данный тест также подтвердил, что блокирование репликации ДНК не препятствует формированию функционального кинетохора: количество BubR1 и p150glued было снижено из-за отсутствия в экстрактах Bub1, однако связывание этих белков с хроматином не было полностью нарушено, как в случае с кинетохорами ЦСФ-хромосом, сформированных в экстрактах, лишенных эндогенного Bub1 (ср. рис 2, б и $3, \delta$). Основываясь на этих результатах, мы заключили, что репликация ДНК спермия не влияет на формирование кинетохора в последующем митозе.

Формирование функционального кинетохора не требует сборки ядерной оболочки в предшествующей интерфазе. Во время интерфазы хроматин обычно деконденсирован и окружен ядерной оболочкой (ЯО). Легко предположить, что эта деконденсация и(или) образование ЯО могли бы вносить свой вклад в формирование кинетохора в последующем митозе, так как эти процессы увеличивают доступность хроматина для факторов, накопленных в ядре в ходе ядерно-цитоплазматического транспорта. Слияние мембранных везикул при образовании ЯО и формирование ядерных пор невозможны без гидролиза ГТФ малой ГТФазой Ran (Herzer et al., 2000). Эти процессы могут быть заблокированы добавлением в систему мутантных форм Ran (Hughes et al., 1998). Мы добавили перед инициацией интерфазы 0.5 мкМ Ran-T24N или 100 мкМ Ran-Q69L в контрольные экстракты и в экстракты, лишенные Bub1. В присутствии мутантных форм Ran вытянутые ядра спермиев превращались в более компактные круглые структуры, которые, однако, содержали сильно конденсированный и гомогенно окрашенный хроматин (рис. 4, а), что полностью согласуется с опубликованными ранее данными (Dasso et al., 1994; Hughes et al., 1998). Через 1 ч инкубации в экстрактах инициировали переход из интерфазы в митоз. Анализ митотического хроматина показал, что обработка экстрактов Ran-T24N или Ran-Q69L не блокирует формирование кинетохоров: количество связанных с хроматином белков BubR1 и р150glued было близким в контрольных и опытных образцах (рис. 4). Мы также обнаружили, что М-хромосомы, сформированные в присутствии Ran-T24N или Ran-Q69L, несут на себе белки наружного кинетохора даже в случае отсутствия в экстрактах Bub1. Основываясь на этих результатах, мы заключили, что формирование ЯО и ядерно-цитоплазматический транспорт в интерфазе не являются необходимыми условиями для сборки функциональных кинетохоров в последующем митозе.

Митотическая конденсация и ремоделинг хроматина спермиев могут быть нарушены при формировании ЦСФ-хромосом. Так как и репликация ДНК, и формирование ядерной оболочки



Рис. 2. Различная чувствительность сборки наружного кинетохора к отсутствию белка Bub1 в ЦСФ- и М-хромосомах.

а — образцы цитоплазматической фракции и очищенные ЦСФ- и М-хромосомы, сформированные в контрольных или в лишенных эндогенного Bub1 экстрактах, анализировали методом Вестерн-блотинга с антителами против указанных белков, количество гистонов H2A/H2B выявляли методом SDS-PAGE с последующей окраской серебром; б — хромосомы анализировали методом непрямой иммунофлуоресценции с антителами против BubR1 (зеленый) и p150^{glued} (красный). ДНК окрашивали красителем Hoechst 33342 (синий— здесь и на рис. 3, 4).

оказались не важны для сборки кинетохора в ходе последующего митоза, мы предположили, что реструктуризация хроматина могла бы быть тем самым событием в интерфазе, которое необходимо для формирования функциональных кинетохоров на хроматине спермия. В ходе сперматогенеза типичные для соматических клеток гистоны частично замещаются на специфические белки спермия, а оставшиеся гистоны подвергаются многочисленным посттрансляционным модификациям (Li, 2002; Lewis et al., 2003). Полагают, что эти изменения приводят к более высокой степени компактизации хроматина. В ходе оплодотворения специфические для спермия белки обычно заменяются на запасенные в цитоплазме яйца гистоны соматического типа (Philpott, Leno, 1992). Мы проверили, не нарушен ли ремоделинг хроматина спермия при формировании ЦСФ-хромосом. Известно, что метилирование гистона НЗ является одним из механизмов компактизации ДНК в ядре спермия во время спер-







Рис. 5. Ремоделинг хроматина спермия и конденсация хроматина нарушена при формировании ЦСФ-хромосом.

а, б — морфология ЦСФ- и М-хромосом, панели; а', б' — увеличенное изображение отдельных хромосом; масштабные линейки — 20 и 4 мкм соответственно. в, г — очищенные ЦСФ-, М-хромосомы и хроматин спермиев анализировали методом Вестерн-блотинга с антителами против диметилированной формы (Lys 9) и фосфорилированной формы гистона H3 (в) и методом SDS-PAGE с последующей окраской серебром (г); звездочками отмечены положения белков, предположительно общих для ЦСФ-хромосом и хроматина спермиев, д — очищенные ЦСФ- и М-хромосомы анализировали методом Вестерн-блотинга с антителами против Smc2 и ДНК Топоизомеразы II (Торо II). Гистоны H2A/H2B использовали в качестве контроля одинаковой нагрузки на гель.

матогенеза (Li, 2002; Rousseaux et al., 2005). Мы нашли, что уровень диметилирования гистона H3 был относительно высоким в ЦСФ-хромосомах и близким к степени диметилирования гистона H3 на хроматине спермия. При этом уровень диметилирования гистона H3 на М-хромосомах был практически недетектируемым (рис. 5, *a*). Мы также сравнили общий состав связанных с хроматином белков в ЦСФ- и М-хромосомах и белковый состав нативного хроматина спермия. Было также отмечено, что спектр белков, связанных с ЦСФ-хромосомами, совмещает в себе особенности, характерные как для хроматина спермия, так и для реплицированного митотического хроматина (рис. 5, *в*).

Упаковка хроматина высшего порядка играет немаловажную роль при сборке кинетохора (Gilbert, Allan, 2001). Для того чтобы выявить существование различий в степени конденсации хроматина в ЦСФ- и М-хромосомах, мы проверили количество связанных с ДНК основных регуляторов формирования митотических хромосом — конденсина и ДНК-топоизомеразы II (Swedlow, Hirano, 2003; Gassmann et al., 2004). Количество Smc2 (одной из субъединиц конденсации) и ДНК-топоизомеразы II было выше в ЦСФ-хромосомах (рис. 5, ∂), что указывает на возможность существования различий в упаковке ЦСФ- и М-хромосом. Основываясь на полученных результатах, мы заключили, что ЦСФ-хромосомы неэффективно обменивают белки, специфичные для хроматина спермия, и накапливают большее количество факторов, участвующих в конденсации хромосом.

Обсуждение

Мы показали, что строение кинетохоров, сформированных на ЦСФ-хромосомах, нарушено. Во-первых, нарушена локализация компонентов ВЦД (рис. 1, δ). Во-вторых, уровень белков наружного кинетохора на таких хромосомах снижен относительно уровня этих белков на М-хромосомах (рис. 1, a). В-третьих, формирование таких кинетохоров полностью зависит от присутствия белка Bub1: истощение Bub1 из экстрактов блокирует формирование наружного кинетохора в ЦСФ-хромосомах, тогда как кинетохоры М-хромосом и хромосом соматических клеток формируются и в отсутствие Bub1, хотя и не так эффективно, как в контрольных экстрактах (рис. 2) (Johnson et al., 2004).

Почему для формирования функционального кинетохора хроматин спермия обязательно должен пройти через интерфазу? Существует ряд специфичных для интерфазы процессов, которые могли бы изменить состояние хроматина спермия. Мы обнаружили, что те интерфазные изменения в статусе хроматина, которые позволят в последующем митозе сформировать полностью функциональный кинетохор, не зависят от репликации ДНК (рис. 3). Мы также показали, что блокирование сборки ЯО и ядерно-цитоплазматического транспорта не приводит к серьезным изменениям в структуре кинетохора (рис. 4).

Во время оплодотворения вход спермия в ооцит вызывает быстрый выход ооцита из митотического ареста. Таким образом, в момент попадания спермия в цитоплазму яйца сама яйцеклетка уже находится в интерфазе. Организация ДНК спермия сильно отличается от организации хроматина в соматическом ядре. Хроматин спермия содержит специфические протамин-подобные белки, присутствие которых приводит к суперкомпактизации ДНК (Risley et al., 1986). В яйце эти специфические белки обмениваются на гистоны H2A/H2B (Philpott, 1992) и некоторые другие структурные белки, характерные для хроматина соматических клеток (Dimitrov et al., 1994). Следовательно, метод формирования хромосом из хроматина спермиев непосредственно в ЦСФ-экстрактах является крайне искусственным. Основываясь на наших данных, мы предполагаем, что при формировании хромосом в ЦСФ-экстрактах ремоделинг хроматина спермия в хроматин соматического типа нарушается из-за проходящей одновременно с этим ремоделингом митотической конденсации хроматина; подобное нарушение приводит к образованию неестественной упаковки хроматина и изменениям в структуре хромосом. Это предположение отчасти подтверждается тем фактом, что количество конденсина и ДНК-топоизомеразы II увеличено на ЦСФ-хромосомах по сравнению с М-хромосомами (рис. 5, г). Увеличение количества связанных с ДНК компонентов, участвующих в конденсации хроматина (Gassmann et al., 2004), может отражать нарушения в организации ЦСФ-хромосом. Наше предположение о нарушении ремоделинга хроматина спермия при одновременной конденсации митотических хромосом также подтверждается повышенной степенью метилирования гистона НЗ в ЦСФ-хромосомах, близкой к степени его метилирования в хроматине спермия, а не в М-хромосомах (рис. 5, б). Кроме того, мы предполагаем, что нарушенная структура ЦСФ-хромосом может физически препятствовать связыванию компонентов кинетохора с центромерным районом. Известно, что конденсин опосредует формирование положительных петель при взаимодействии с голой ДНК так же эффективно, как и при взаимодействии с ДНК, содержащей нуклеосомы (De la Barre et al., 2000). Следовательно, можно предположить, что быстрая конденсация ДНК спермия, в которой происходит замена протаминов на гистоны, приведет к формированию хроматина с неестественной упаковкой.

Таким образом, наше исследование показало, что кинетохоры сформированные н ЦСФ-хромосомах, имеют аберрантную структуру и, следовательно, не могут использоваться в качестве модельной системы. Мы считаем, что дальнейшие исследования должны проводиться исключительно на физиологически оптимальной модели — М-хромосомах.

Список литературы

Azuma Y., Arnaoutov A., Dasso M. 2003. SUMO-2/3 regulates topoisomerase II in mitosis. J. Cell Biol. 163 : 477–487.

Chan G. K., Liu S. T., Yen T. J. 2005. Kinetochore structure and function. Trends Cell Biol. 15: 589-598.

Chen R. H. 2002. BubR1 is essential for kinetochore localization of other spindle checkpoint proteins and its phosphorylation requires. Mad1. J. Cell. Biol. 158 : 487–496.

Cleveland D. W., Mao Y., Sullivan K. F. 2003. Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. Cell. 112 : 407–421.

Dasso M., Seki T., Azuma Y., Ohba T., Nishimoto T. 1994. A mutant form of the Ran/TC4 protein disrupts nuclear function in

Xenopus laevis egg extracts by inhibiting the RCC1 protein, a regulator of chromosome condensation. EMBO J. 13 : 5732—5744.

De la Barre A. E., Gerson V., Gout S., Creaven M., Allis C. D., Dimitrov S. 2000. Core histone N-termini play an essential role in mitotic chromosome condensation. EMBO J. 19: 379–391.

De la Barre A. E., Robert-Nicoud M., Dimitrov S. 1999. Assembly of mitotic chromosomes in *Xenopus* egg extract. Methods Mol. Biol. 119 : 219–229.

Desai A., Murray A., Mitchison T. J., Walczak C. E. 1999. The use of *Xenopus* egg extracts to study mitotic spindle assembly and function *in vitro*. Methods Cell Biol. 61 : 385–412.

Dimitrov S., Dasso M. C., Wolffe A. P. 1994. Remodeling sperm chromatin in *Xenopus laevis* egg extracts: the role of core histone phosphorylation and linker histone B4 in chromatin assembly. J. Cell Biol. 126 : 591–601.

Gassmann R., Vagnarelli P., Hudson D., Earnshaw W. C. 2004. Mitotic chromosome formation and the condensin paradox. Exp. Cell Res. 296 : 35–42.

Gilbert N., Allan J. 2001. Distinctive higher-order chromatin structure at mammalian centromeres. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 98 : 11 949—11 954.

Hetzer M., Bilbao-Cortes D., Walther T. C., Gruss O. J., Mattaj I. W. 2000. GTP hydrolysis by Ran is required for nuclear envelope assembly. Mol. Cell. 5 : 1013–1024.

Hughes M., Zhang C., Avis J. M., Hutchison C. J., Clarke P. R. 1998. The role of the ran GTPase in nuclear assembly and DNA replication: characterization of the effects of Ran mutants. J. Cell Sci. 111 (Pt 20) : 3017—3026.

Johnson V. L., Scott M. I., Holt S. V., Hussein D., Taylor S. S. 2004. Bub1 is required for kinetochore localization of BubR1, Cenp-E, Cenp-F and Mad2, and chromosome congression. J. Cell Sci. 117 : 1577–1589.

Kornbluth S., Yang J., Powers M. 2001. Analysis of the cell cycle using *Xenopus* egg extracts. Current protocols in cell biol.: 11.11.11.—11.11.13.

Lewis J. D., Abbott D. W., Ausio J. 2003. A haploid affair: core histone transitions during spermatogenesis. Biochem. Cell. Biol. 81 : 131–140.

Li E. 2002. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. Nat. Rev. Genet. 3 : 662–673.

Losada A., Hirano M., Hirano T. 1998. Identification of *Xenopus* SMC protein complexes required for sister chromatin cohesion. Genes Develop. 12 : 1986—1997.

Maiato H, DeLuca J., Salmon E. D., Earnshaw W. C. 2004. The dynamic kinetochore-microtubule interface. K. Cell. Sci. 117 : 5461—5477.

Maresca T. J., Freedman B. S., Heald R. 2005. Histone H1 is essential for mitotic chromosome architecture and segregation in *Xenopus laevis* egg extracts. J. Cell Biol. 169 : 859–869.

Maresca T. J., Heald R. 2006a. Methods for studying spindle assembly and chromosome condensation in *Xenopus* egg extracts. Methods Mol. Biol. 322 : 459–474.

Maresca T. J., Heald R. 2006b. The long and the short of it: linker histone H1 is required for metaphase chromosome compaction. Cell Cycle. 5 : 589—591.

Meraldi P., McAinsh A. D., Rheinbay E., Sorger P. K. 2006. Phylogenetic and structural analysis of centromeric DNA and kinetochore proteins. Genome Biol. 7 : R23.

Ohsumi K., Katagiri C., Kishimoto T. 1993. Chromosome condensation in *Xenopus* mitotic extracts without histone H1. Science. 262 : 2033–2035.

Philpott A., Leno G. H. 1992. Nucleoplasmin remodels sperm chromatin in *Xenopus* egg extracts. Cell. 69 : 759—767.

Risley M. S., Einheber S., Bumcrot D. A. 1986. Changes in DNA topology during spermatogenesis. Chromosoma. 94 : 217–227.

Rivera T., Losada A. 2006. Shugoshin and PP2A, shared duties at the centromere. BioEssays. 28 : 775—779.

Rousseaux S., Caron C., Govin J., Lestrat C., Faure A. K., Khochbin S. 2005. Establishment of male-specific epigenetic information. Gene. 345 : 139—153.

511

Sawin K. E., Mitchison T. J. 1991. Mitotic spindle assembly by two different pathways in vitro. J. Cell Biol. 112 : 925–940.

Sharp-Baker H., Chen R. H. 2001. Spindle checkpoint protein Bub1 is required for kinetochore localization of Mad1, Mad2, Bub3, and CENP-E, independently of its kinase activity. J. Cell. Biol. 153 : 1239—1250.

Smythe C., Newport J. W. 1991. System for the study of nuclear assembly, DNA replication, and nuclear breakdown in *Xenopus laevis* egg extracts. Methods Cell Biol. 35 : 449–468.

Swedlow J. R., Hirano T. 2003. The making of the mitotic chromosome: modern insights into classical questions. Mol. Cell. 11: 557—569.

Tutter A. V., Walter J. C. 2006. Chromosomal DNA replication in a soluble cell-free system derived from *Xenopus* eggs. Methods Mol. Biol. 322 : 121–137.

Vigneron S., Prieto S., Bernis C., Labbe J. C., Castro A., Lorca T. 2004. Kinetochore localization of spindle checkpoint proteins: who controls whom? Mol. Biol. Cell. 15 : 4584—4596.

Поступила 6 Х 2006

ASSEMBLY OF CORRECT KINETOCHORE ARCHITECTURE IN *XENOPUS* EGG EXTRACT REQUIRES TRANSITION OF SPERM DNA THROUGH INTERPHASE

E. Yu. Boyarchuk, 1, 2 N. N. Nikolsky, 1 M. Dasso, 2 A. M. Arnaoutov^{2, *}

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia, and ² Laboratory of Gene Regulation and Development, NICHD, NIH, Bethesda, USA; * e-mail: arnaouta@mail.nih.gov

Xenopus egg extracts provide a powerful tool for studying formation and function of chromosomes. Two alternative protocols are generally used to obtain mitotic chromosomes. The first one employs direct assembly of chromatin from sperm nuclei in CSF-arrested meiotic extracts, while the second is based on transition of sperm DNA through a replication step, followed by re-establishing of CSF arrest. In this study we show that general kinetochore structure is disrupted in chromosomes assembled directly in CSF egg extracts: the amounts of outer kinetochore proteins such as Bub1, BubR1 and Dynactin subunit p150^{glued} are reduced and the components of the inner centromeric region (Aurora B kinase and Survivin) show compromised recruitment to centromeres. In contrast, kinetochores on chromosomes assembled according to the second protocol closely resemble those in somatic cells. Our results argue that transition of sperm nuclei through interphase is an essential step for proper kinetochore assembly.

Key words: kinetochore, Xenopus laevis, Xenopus egg extract, chromosome.