

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЯДЕРНОГО МАТРИКСА ХРОМОЦЕНТРОВ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ФИБРОБЛАСТОВ МЫШИ

© *Е. В. Шеваль, В. Ю. Поляков*

*НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова
и ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, Москва;
электронный адрес: sheval_e@genebee.msu.su*

Изучена структурная организация ядерного матрикса гомогенных по составу хроматиновых локусов — блоков прицентромерного гетерохроматина (хромоцентров) в клетках культивируемых фибробластов мыши. В ядрах клеток после экстракции 2 М NaCl без обработки ДНКазой I хромоцентры сильно набухают и не выявляются при электронной микроскопии. Иммуноэлектронная микроскопия с использованием антител против топоизомеразы Po показала, что в таких условиях остаточные хромоцентры распадаются на множество дискретных агрегатов. После экстракции без предварительной обработки ДНКазой I остаточные хромоцентры образованы плотной сетью тонкофибрилярного материала и по этому признаку надежно морфологически отличаются от остальной сети ядерного матрикса. После экстракции смесью сульфата декстрана и гепарина хромоцентры деконденсируются, при этом в их составе выявляются хроматиновые комплексы, образованные радиальнорасходящимися из одного центра фибриллами ДНК. Эти комплексы, вероятно, представляют собой результат частичной декомпактизации петлевых доменов. Таким образом, показано отличие морфологии ядерного матрикса определенного района хромосом (хромоцентров) от общей сети ядерного матрикса.

Ключевые слова: ядерный матрикс, прицентромерный гетерохроматин, хромоцентры.

В рамках радиально-петельной модели остаточным белкам (устойчивым к солевой экстракции) приписывается важная роль в формировании хроматина, поддержании структурной целостности различных ядерных компартментов и трехмерной организации ядер. Распространено мнение о том, что эти белки формируют особые структуры: в составе интерфазных ядер — ядерный матрикс (см. обзоры: Збарский, Кузьмина, 1991; Tsutsui et al., 2005), и митотических хромосом — хромосомный скэффолд (см. обзор: Шеваль, Поляков, 2006). Другой взгляд на природу остаточных структур состоит в том, что ядерный матрикс и скэффолд возникают в ходе экстракции под действием солевого раствора из тех белков и РНК, которые в момент экстракции были связаны со своими функциональными сайтами (Hancock, 2000; Tan et al., 2000; Sheval et al., 2009).

Структурная организация ядерного матрикса изучена достаточно подробно (Збарский, Кузьмина, 1991), однако в литературе можно найти единичные работы, посвященные анализу организации матрикса определенных локусов хромосом (Gerdes et al., 1994; Bickmore, Oghene, 1996; Rättsch et al., 2002; Iarovaia et al., 2004). В этих работах основное внимание уделяется визуализации петель ДНК определенных генов или локусов хромосом (центромеры, теломеры) в составе экстрагированных без обработки нуклеазой ядер (нуклеоидов). При этом особенности структурной организации ядерного матрикса каких-либо локальных локусов хромосом остаются неизвестными.

В настоящей работе проанализирована структура ядерного матрикса хромоцентров мыши, которые представляют собой скопления блоков прицентромерного гетерохроматина в интерфазных ядрах культивируемых фибробластов мыши.

Материал и методика

Мышечные фибробласты (линия L929) культивировали в среде ДМЕМ с добавлением 10 % сыворотки крупного рогатого скота и антибиотиков. Для получения хромосомных препаратов к клеткам добавляли 0.1 мкг/мл нокодазола на 2 ч, после чего клетки снимали смесью версена и трипсина, инкубировали 10 мин в 0.075 М растворе KCl и фиксировали смесью метанола и ледяной уксусной кислоты (3 : 1). Фиксированные клетки раскапывали на влажные холодные покровные стекла, которые в дальнейшем использовали для проведения гибридизации.

Процедуру экстракции белков из интерфазных ядер и митотических хромосом в пермеабилizированных клетках проводили по методике, описанной подробно ранее (Шеваль и др., 2005; Sheval, Polyakov, 2006). Клетки, растущие на покровных стеклах, пермеабилizировали 10 мин в трех сменах раствора, содержащего 50 мМ Трис-HCl, pH 7.6, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ CuSO₄, 1 мМ PMSF и 1 % Тритона X-100. Затем клетки быстро промывали в трех сменах того же буфера без детергента, после чего бу-

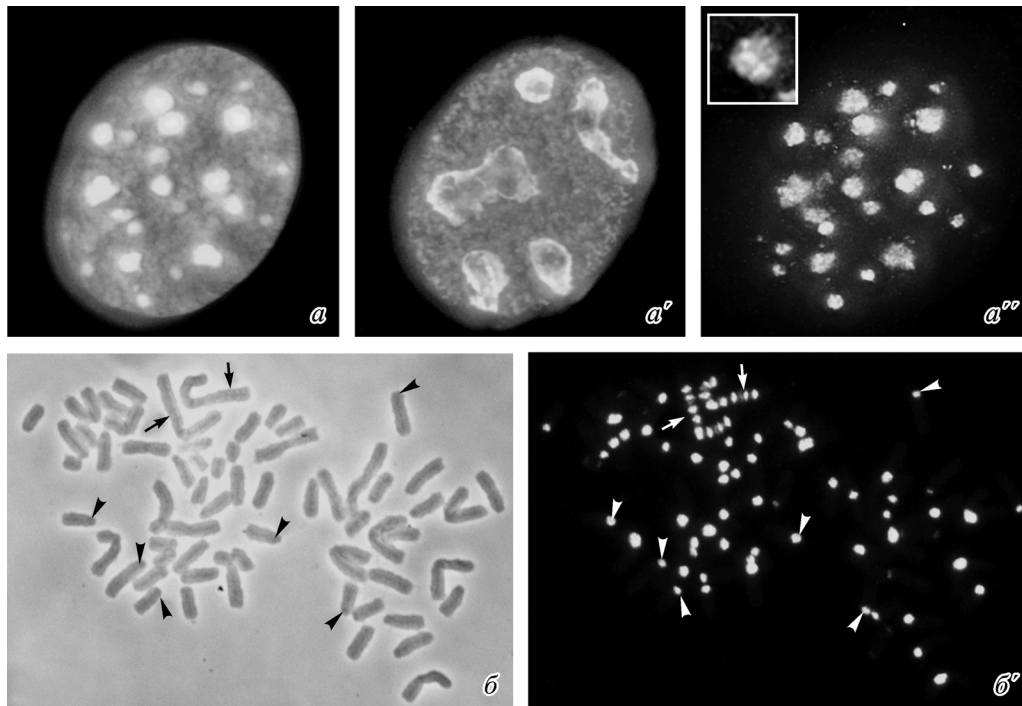


Рис. 1. Хромоцентры в культивируемых фибробластах мыши линии L929.

a—a'' — общая морфология хромоцентров и локализация в них большого сателлита. Представленные изображения являются проекцией оптических сечений всего объема клетки после деконволюции. *a* — окрашивание Хёхстом 33258, *a'* — окрашивание антителами к B23 (общая морфология ядрышек), *a''* — выявление большого сателлита. На *врезке* увеличен один из хромоцентров. Большой сателлит распределен в составе хромоцентра неравномерно. *б—б'* — локализация большого сателлита в метафазных хромосомах. Большой сателлит локализуется в прицентромерных районах (*головики стрелок*) и в интеркалярных районах метафазной хромосомы, характерной для этой линии мышинных фибробластов (*стрелки*).

фер замещали на экстрагирующий раствор. Экстракцию проводили одним из двух растворов: 1) 2 М NaCl, 10 мМ ЭДТА и 20 мМ Трис-НСl (рН 7.6); 2) 2 мг/мл сульфата декстрана, 0.2 мг/мл гепарина, 10 мМ ЭДТА и 20 мМ Трис-НСl (рН 7.6). В некоторых экспериментах клетки обрабатывали сразу после пермеабилзации ДНКазой I (100 мкг/мл) в течение 15 мин при 37 °С.

Для световой микроскопии фиксацию производили 2%-ным параформальдегидом, приготовленным на экстрагирующем растворе, в течение 15 мин при комнатной температуре. Инкубацию с антителами против топоизомеразы IIα (1 : 50) проводили при 25 °С в течение 45 мин. После отмывки клетки инкубировали с Алекса488-конъюгированными антителами (Molecular Probes, США), докрасивали раствором Хёхста 33258 (0.1 мкг/мл; Sigma, США) и заключали в Мовиол (Calbiochem, США).

Для электронной микроскопии препараты фиксировали 1%-ным глутаральдегидом, приготовленным на буфере 1 или 2, в течение 2 ч при комнатной температуре, дополнительную фиксацию проводили в 1%-ном растворе OsO₄, после чего клетки заключали в Эпон 812 (Fluka, США). Ультратонкие срезы изучали в электронном микроскопе NU-11В (Hitachi, Япония).

Иммуноэлектронную микроскопию проводили с использованием нанозолота (диаметр частиц 1.4 нм) и реакции серебряного усиления. Для этого клетки фиксировали и окрашивали первыми антителами так же, как и для световой микроскопии, после чего проводили инкубацию с конъюгированными с нанозолотом Fab-фрагментами (Nanoprobe, США). После отмывки клетки повторно фиксировали 1%-ным глутаральдегидом в течение 2 ч. Реакцию серебряного усиления проводили по стандартной методике (Gilerovitch et al., 1995).

Зонд для флуоресцентной гибридизации *in situ* готовили с помощью полимеразной цепной реакции, полученный фрагмент метили с использованием набора для мечения ULS (Fermentas, Литва).

Результаты и обсуждение

Хромоцентры в культивируемых клетках мыши отчетливо видны при окрашивании ДНК флуорохромом Хёхстом 33258 как округлые блоки, более яркие на фоне основной массы диффузного хроматина (рис. 1, *a*). Более акkuratно хромоцентры могут быть выявлены либо с помощью антител к белкам гетерохроматина, либо с использованием гибридизации *in situ*. Для экспериментов по гибридизации выбран большой сателлит прицентромерного гетерохроматина. В клетках линии L929 большой сателлит содержится не только в прицентромерных районах, но и в нескольких крупных интеркалярных блоках одной из хромосом, маркерной для этой линии клеток (рис. 1, *б*, *б'*). В интерфазных клетках суммарное число хромоцентров существенно ниже, чем общее количество центромер во всех хромосомах в митозе. Это объясняется ассоциацией прицентромерных районов хромосом, ведущей к формированию крупных хромоцентров интерфазных ядер. Хромоцентры могут локализоваться в нуклеоплазме, на периферии ядер либо на поверхности или внутри ядрышек (рис. 1, *a*, *a'*), причем наиболее крупные блоки выявляются в ассоциации с ядрышками. Также необходимо отметить, что если при окрашивании Хёхстом 33258 крупные хромоцентры имеют гомогенную структуру, т. е. ДНК распределена в составе хромоцентров гомогенно (рис. 1, *a*), то большой сателлит распределен в них

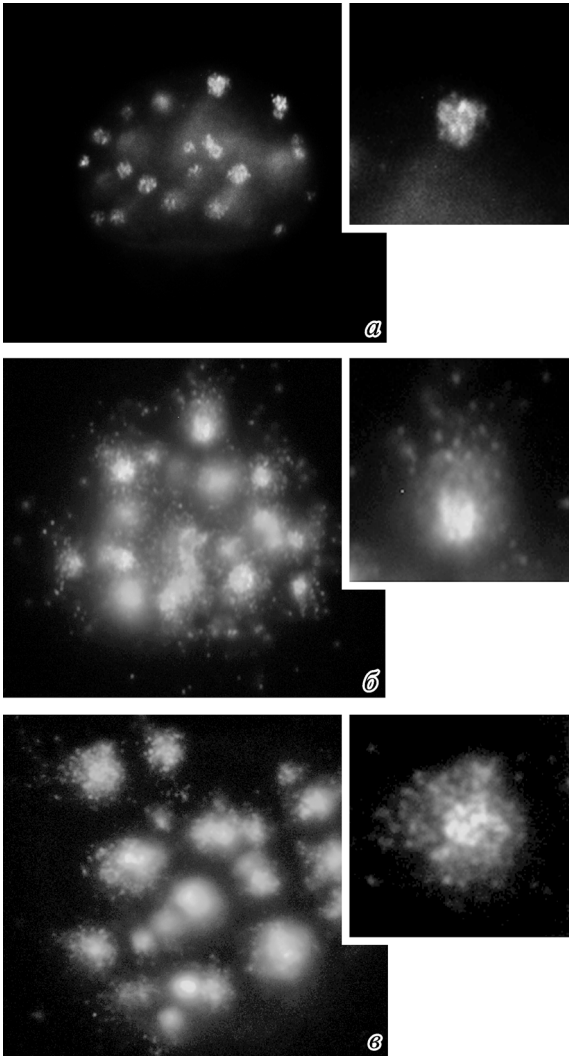


Рис. 2. Локализация большого сателлита в культивируемых фибробластах мыши.

a — фиксация *in situ*; *b* — экстракция 2 М NaCl; *v* — экстракция смесью полианионов (сульфат декстрана и гепарина). На *врезках* — увеличенные фотографии одного из хромосомов.

неравномерно (рис. 1, *a''*). Неоднородность распределения большого сателлита в хромосомах может определяться тем, что это не единственный тип сателлита, описанный в составе прицентромерного гетерохроматина (Kuznetsova et al., 2005), причем показано, что разные сателлиты сгруппированы в отдельные кластеры (Kuznetsova et al., 2006).

Экстракцию белков из ядер пермеабелизованных клеток проводили двумя способами: с использованием 2 М NaCl и смеси полианионов (сульфата декстрана и гепарина). Гибридизация *in situ* показала, что при использовании обоих протоколов происходит разрушение плотных хромосомов (рис. 2, *a*) и сателлитная ДНК выявляется в виде многочисленных точек в локальных зонах остаточных ядер (рис. 2, *b*, *v*). В качестве основного маркера на хромосомы были использованы антитела к топоизомеразе $\text{P}\alpha$ — одному из наиболее изученных белков ядерного матрикса. Этот белок накапливается в хромосомах мыши на стадии G_2 клеточного цикла (Rattner et al., 1996), и именно такие клетки были отобраны для анализа. В клетках, фиксированных *in situ*, топоизомеразы

$\text{P}\alpha$ выявляется в хромосомах и в нуклеоплазме (рис. 3, *a*). Хромосомы окрашиваются антителами практически гомогенно. После солевой экстракции (без дополнительной нуклеазной обработки) интенсивность окрашивания нуклеоплазмы по сравнению с интенсивностью окрашивания хромосом уменьшается, что говорит о частичной экстракции белка (рис. 3, *b*). После экстракции морфология мелких хромосом не изменяется, в то время как крупные хромосомы сильно набухают и теряют гомогенность структуры — в их составе выявляются отдельные гранулы, обычно связанные в цепочки. ДНК после экстракции выходит за пределы ядер, однако в районах хромосом интенсивность флуоресценции Хёхста 33258 остается повышенной (рис. 3, *b'*). Таким образом, экстракция белков не приводит к полному разрушению хромосом. Обращает на себя внимание факт, что размеры экстрагированных хромосом, окрашенных флуорохромом Хёхстом 33258, визуально больше размеров тех же структур, окрашенных антителами к топоизомеразе $\text{P}\alpha$. При этом интенсивность флуоресценции Хёхста 33258 в районах остаточных хромосом не коррелирует с интенсивностью флуоресценции антител (т. е. с содержанием топоизомеразы $\text{P}\alpha$).

Окрашивание клеток, обработанных 2 М NaCl после предварительной обработки ДНКазой I, также показывает, что топоизомеразы $\text{P}\alpha$ входят в состав ядерного матрикса хромосом, однако набухания хромосом, столь типичного для экстракции без предварительной нуклеазной обработки, не происходит (рис. 3, *v*).

Кроме солевой экстракции мы использовали экстракцию смесью полианионов (сульфата декстрана и гепарина). Экстракция без нуклеазной обработки приводит к набуханию хромосом, однако характер этого набухания резко отличается от набухания хромосом после солевой экстракции (рис. 3, *v*). В последнем случае концентрации ДНК снижаются по мере удаления от центра остаточных хромосом и зоны повышенной концентрации ДНК не имеют четкой границы. Набухшие в результате экстракции поликатионами хромосомы сохраняют равномерность распределения ДНК и четкие контуры. Топоизомеразы $\text{P}\alpha$ выявляются во всем объеме набухших хромосом, но распределение белка неравномерное. Если экстракции предшествует обработка ДНКазой I, то выявляются плотные остаточные хромосомы, в которых локализация топоизомеразы $\text{P}\alpha$ идентична наблюдаемой после солевой экстракции (рис. 3, *d*).

Таким образом, при анализе локализации топоизомеразы $\text{P}\alpha$ в экстрагированных клетках выявлено, что два разных типа экстракции приводят к различным результатам, если не проводилась обработка ДНКазой I. При солевой экстракции формируются структуры, которые можно назвать «мини-нуклеоидами». Эти образования состоят из центральной области, содержащей топоизомеразу $\text{P}\alpha$, и окружающего гало из петель сателлитной ДНК. Центральная часть (т. е. собственно ядерный матрикс) несколько деконденсируется, что позволяет выявить топоизомеразы $\text{P}\alpha$ -содержащие гранулы и цепочки гранул, в то время как структура неэкстрагированных хромосом практически гомогенна. Экстракция полианионами ведет к заметному набуханию хромосом, но «мини-нуклеоиды» не формируются. Это косвенно свидетельствует о том, что как полной экстракции белков петлевых доменов, так и полной релаксации ДНК в данном случае не происходит. Если экстракции предшествовала обработка нуклеазой, то структура ядерного матрикса

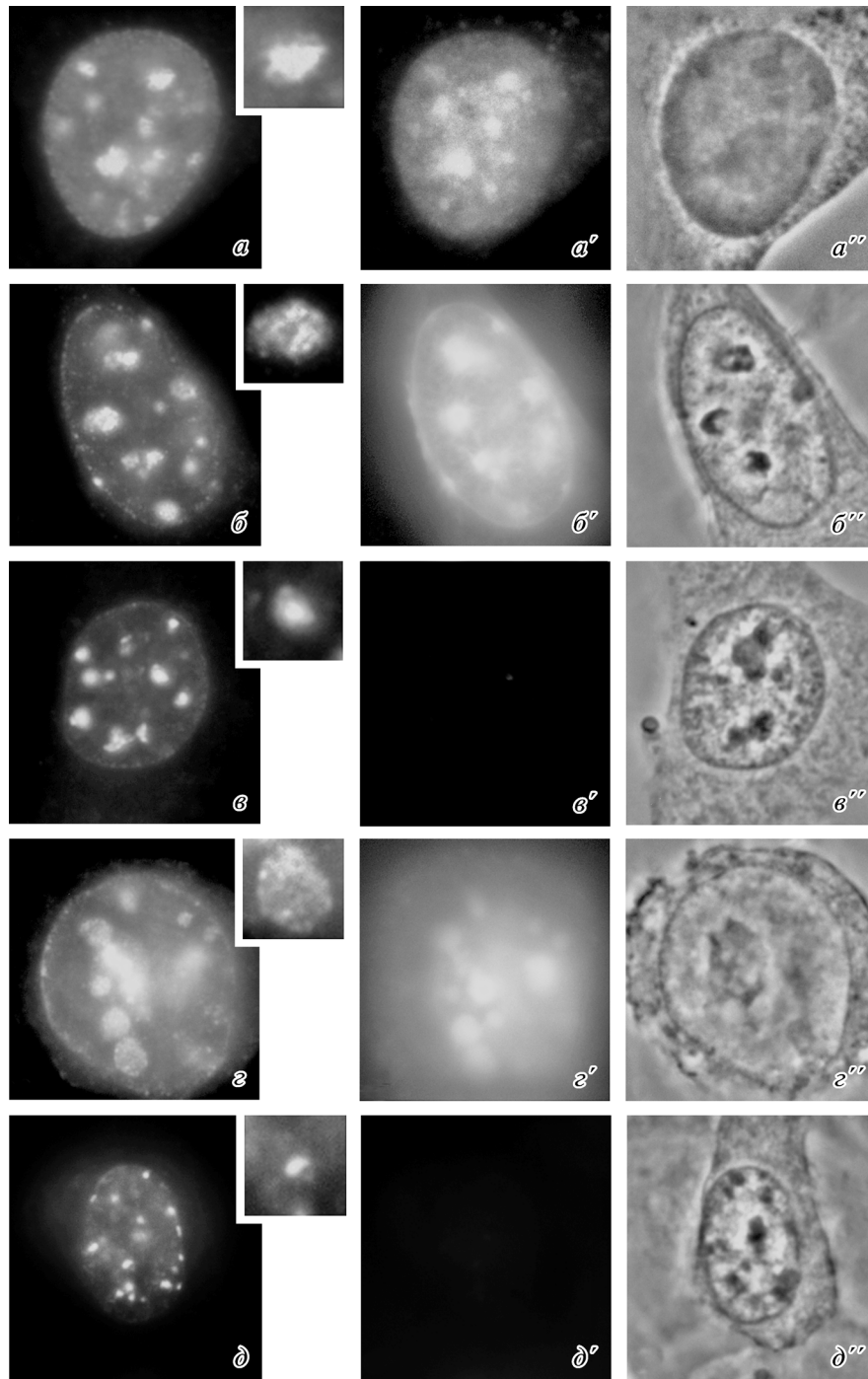


Рис. 3. Локализация топоизомеразы в ядрах фибробластов мыши.

a — клетки, фиксированные *in situ*; *b* — клетки после экстракции 2 М NaCl; *в* — клетки после обработки ДНКазой I и экстракции 2 М NaCl; *г* — клетки после экстракции полианионами; *д* — клетки после обработки ДНКазой I и экстракции полианионами. На *врезках* — увеличенное изображение одного из хромоцентров. *a'*—*д'* — распределение ДНК (окрашивание красителем Хёхстом 33258); *a''*—*д''* — фазовый контраст.

са не зависит от использовавшегося для экстракции раствора.

Для изучения морфологии остаточных структур мы провели ультраструктурное изучение клеток после процедуры экстракции. В клетках, обработанных 2 М NaCl без ДНКазы, внутри остаточных ядер выявляются остаточные ядрышки и фрагменты внутренней сети ядерного матрикса (рис. 4, *a*). Выявить остаточные хромоцентры не удается. Следует отметить, что ранее мы уже сталкивались с тем, что при использовании стандарт-

ной электронной микроскопии выявление остаточных структур не всегда возможно. Так, нам не удалось морфологически идентифицировать элементы хромосомного скэффолда в метафазных клетках после обработки 2 М NaCl (Шеваль и др., 2005), хотя позднее с использованием ультраструктурной иммуоцитохимии эти элементы были надежно определены (Sheval, Polyakov, 2006). Поэтому для уточнения наблюдений, сделанных морфологически, была проведена иммуоэлектронная микроскопия.

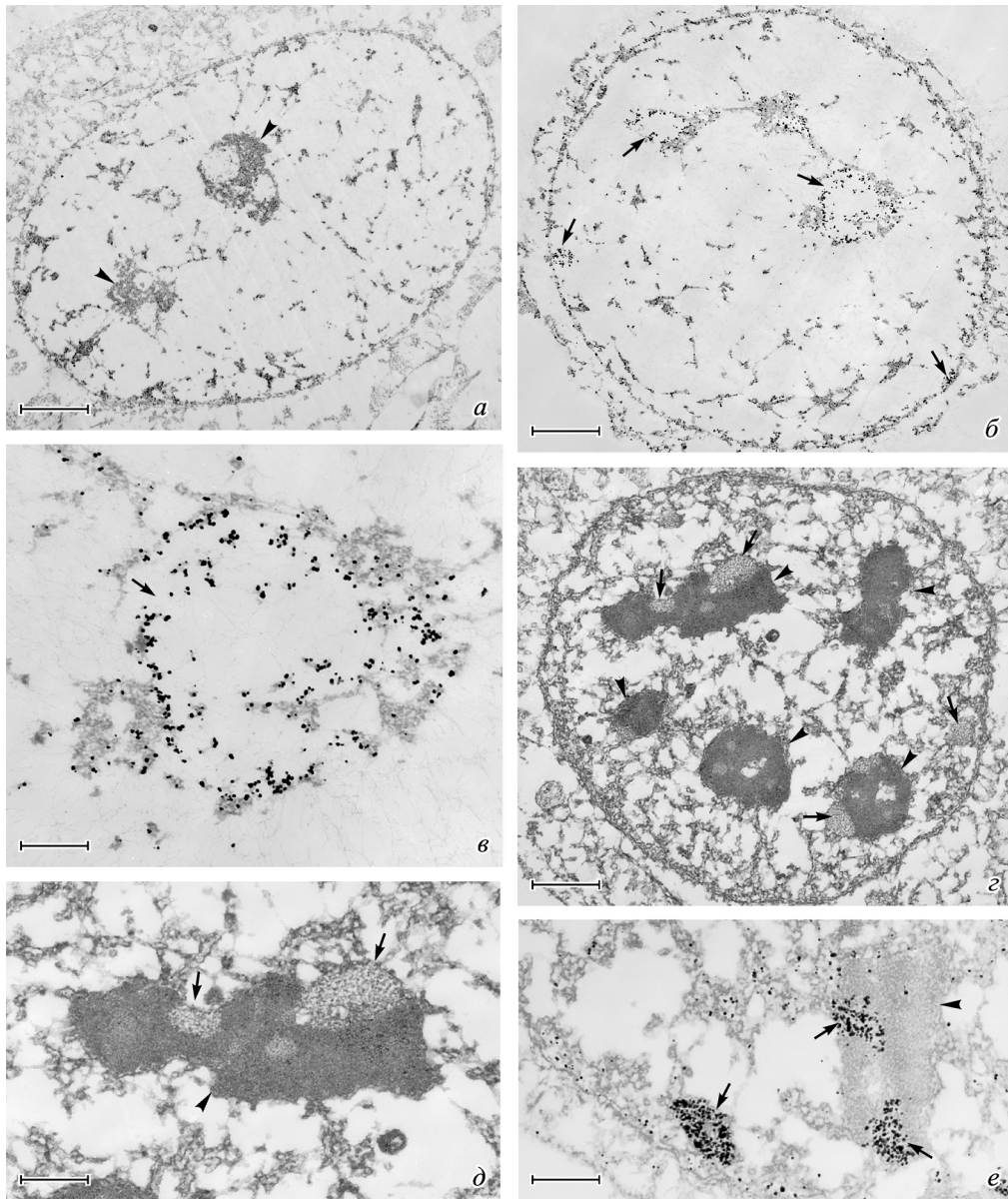


Рис. 4. Электронные микрофотографии клеток после экстракции 2 М NaCl без предварительной обработки ДНКазой I (а—в) или после нуклеазной обработки (г—е).

Здесь и на рис. 5: для иммуноэлектронной микроскопии использовали антитела к топоизомеразе IIa (б, в, е); стрелки — остаточные хромоцентры, головки стрелок — ядрышки. Масштабные линейки — 2 (а, б, г), 0,5 (в) или 1 (д, е) мкм.

После экстракции 2 М NaCl без предварительной обработки нуклеазой в ядрах выявляются скопления топоизомеразы IIa, которые соответствуют хромоцентрам (рис. 4, б). От этих скоплений во все стороны расходятся нити дегистонизированной ДНК, которые могут являться частью «мини-нуклеоидов», выявляемых при гибридизации *in situ* (рис. 4, в). Обращает на себя внимание, что топоизомераза IIa выявляется не в составе плотного материала (остаточных ядрышек или внутренней сети ядерного матрикса), а в составе отдельных, небольших агрегатов устойчивого к экстракции материала, причем отдельные агрегаты морфологически не связаны друг с другом. Это подтверждает, что в данном случае остаточные хромоцентры очень сильно набухают в ходе экстракции, что и затрудняет их визуализацию без применения иммунохимических методик.

В клетках, обработанных ДНКазой I перед экстракцией, остаточные ядрышки плотные, внутренняя сеть ядерного матрикса сформирована толстыми фибриллами, образующими плотную сеть (рис. 4, г). Рядом с ядрышками и на периферии ядер обнаруживаются менее плотные округлые образования, локализация которых совпадает с локализацией хромоцентров в нативных клетках (рис. 4, д). Мы предположили, что это остаточные хромоцентры, в пользу чего свидетельствуют данные по окрашиванию антителами, конъюгированными с золотом (рис. 4, е). Остаточные хромоцентры образованы тонкими фибриллами, формирующими плотную гомогенную сеть.

После экстракции смесью полианионов ядра резко набухают (рис. 5, а). Внутри остаточных ядер хромоцентры легко выявляются как округлые скопления тонкофибрилярного материала (рис. 5, б), содержащие топоизомеразу

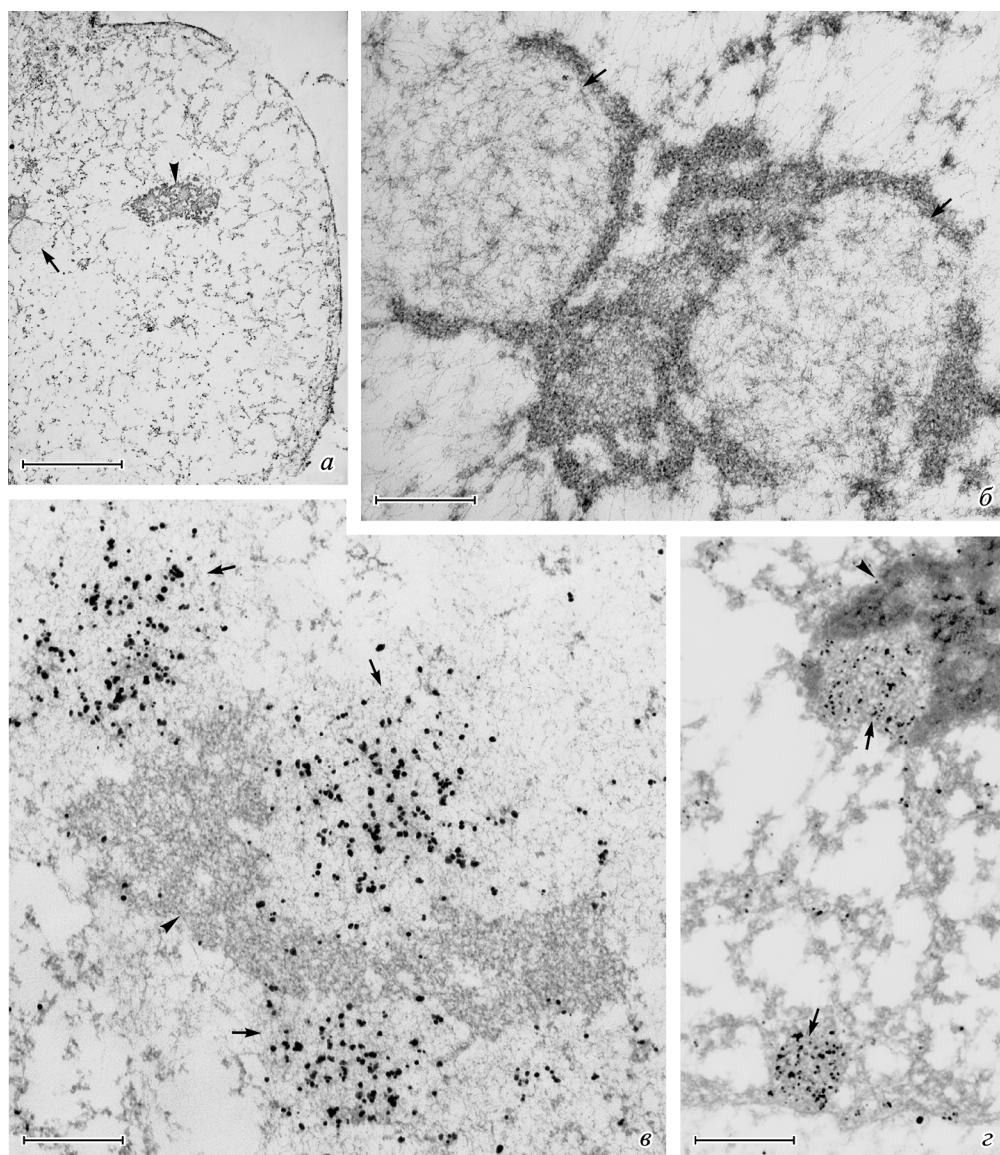


Рис. 5. Электронные микрофотографии клеток после экстракции полианионами без предварительной обработки ДНКазой I (а—в) или после нуклеазной обработки (г).

Масштабные линейки — 2 (а) или 0,25 (б—г) мкм.

Па (рис. 5, в). Анализ материала остаточных хромоцентров при большом увеличении показывает, что они образованы многочисленными фокусами радиальносходящихся хроматиновых фибрилл (рис. 5, б). Если клетки предварительно обрабатывают ДНКазой, то морфология остаточных ядер сходна с таковой для случая солевой экстракции (рис. 5, г).

Таким образом, показано, что солевая экстракция без предварительной нуклеазной обработки ведет к резкому набуханию остаточных хромоцентров. Сходное набухание было описано ранее для целых хромосом метафазных и анафазных клеток (Sheval, Polyakov, 2006). Неожиданной оказалась невозможность выявить ядерный матрикс хромоцентров в такой ситуации, тем более что в ядрах клеток, обработанных ДНКазой I перед экстракцией, остаточные хромоцентры выявляются очень четко. Вероятнее всего, мы имеем дело именно со сложностью выявления, так как, судя по результатам иммуноцитохимии, эти элементы остаются. Видимые элементы

внутренней сети ядерного матрикса могут соответствовать остаточным компонентам (осаждаемым в ходе солевой обработки) интерхроматинового материала (транскрибирующегося хроматина, компонентов процессинга РНК и т. д.), как это обсуждалось в литературе (Berezney, Coffey, 1977; Sheval et al., 2002). Ранее мы показали, что набухание хромосомного скэффолда в ходе экстракции (выражающееся, в частности, в том, что длина остаточных хромосом в несколько раз больше, чем длина интактных хромосом) сопровождается его распадом на отдельные элементы (Sheval, Polyakov, 2006). По-видимому, это происходит под давлением петель дегистонизированной ДНК. В рамках этого легко объяснимо, почему плотными остаются остаточные структуры интерхроматинового материала, который не содержит большого количества конденсированного хроматина. Действительно, если набухание производит давление петель дегистонизированной ДНК, то интерхроматиновый материал, который содержит незначительное количество ДНК, не будет

заметно деконденсироваться. Напротив, блоки гетерохроматина должны деконденсироваться очень сильно, что и наблюдалось в наших экспериментах.

В случае экстракции полианионами выявить материал, который можно было бы надежно отождествить с ядерным матриксом, не удается. Таким образом, рассуждения, сделанные для солевой экстракции, можно распространить и на эту экспериментальную модель. Однако зона остаточных хромосомов пронизана фибриллами ДНК, формирующими плотную сеть. В составе сети можно было выделить отдельные комплексы радиальносходящихся фибрилл. Это наблюдение может свидетельствовать о том, что в случае такой обработки экстрагируются не все белки и как следствие петлевые домены полностью не разворачиваются, т. е. таким способом визуализируются интермедиаты компактизации петлевых доменов. Можно предположить, что в формировании и поддержании структурной целостности хромосомов заметную роль могут играть компоненты, экстрагируемые в ходе стандартной солевой экстракции.

Авторы выражают благодарность Е. П. Сенченкову и А. В. Лазареву (Московский государственный университет) за помощь в проведении электронной микрокопии, К. Tsutsui (Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Япония) за предоставление антител к топоизомеразе II α , Л. В. Исаевой (Московский государственный университет) за помощь в получении зонда для гибридизации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 06-04-49560 и 08-04-00884), Федерального агентства по науке и инновациям (контракт 02.512.12.2011) и президентского гранта поддержки молодых кандидатов наук.

Список литературы

Збарский И. Б., Кузьмина С. Н. 1991. Скелетные структуры клеточного ядра. М.: Наука. 246 с.
 Шеваль Е. В., Курчаева С. Ю., Тимирбулатова Э. Р., Поляков В. Ю. 2005. Получение и характеристика препаратов ядерного матрикса и хромосомного скэффолда *in situ*. Цитология. 47 (1) : 77—82.
 Шеваль Е. В., Поляков В. Ю. 2006. Роль хромосомного скэффолда в поддержании структурной целостности митотических хромосом. Онтогенез. 37 (6) : 405—418.

Berezney R., Coffey D. S. 1977. The nuclear protein matrix: isolation and characterization of a framework structure from rat liver nuclei. *J. Cell Biol.* 73 : 616—637.

Bickmore W. A., Oghene K. 1996. Visualizing the spatial relationships between defined DNA sequences and the axial region of extracted metaphase chromosomes. *Cell.* 84 : 95—104.

Gerdes M. G., Carter K. C., Moen P. T., Lawrence J. B. 1994. Dynamic changes in the higher-level chromatin organization of specific sequences revealed by *in situ* hybridization to nuclear halos. *J. Cell Biol.* 126 : 289—304.

Gilerovitch H. G., Bishop G. A., King J. S., Burry R. W. 1995. The use of electron microscopic immunocytochemistry with silver-enhanced 1.4-nm gold particles to localize GAD in the cerebellar nuclei. *J. Histochem. Cytochem.* 43 : 337—343.

Hancock R. 2000. A new look at the nuclear matrix. *Chromosoma.* 109 : 219—225.

Iarovaia O. V., Bystritskiy A., Ravcheev D., Hancock R., Razin S. V. 2004. Visualization of individual DNA loops and a map of loop domains in the human dystrophin gene. *Nucl. Acids Res.* 32 : 2079—2086.

Kuznetsova I., Podgornaya O., Ferguson-Smith M. A. 2006. High-resolution organization of mouse centromeric and pericentromeric DNA. *Cytogenet. Genome Res.* 112 : 248—255.

Kuznetsova I. S., Prusov A. N., Erukashvily N. I., Podgornaya O. I. 2005. New types of mouse centromeric satellite DNAs. *Chromosome Res.* 13 : 9—25.

Rätsch A., Joos S., Kioschis P., Lichter P. 2002. Topological organization of the MYC/IGK locus in Burkitt's lymphoma cells assessed by nuclear halo preparations. *Exp. Cell Res.* 273 : 12—20.

Rattner J. B., Hendzel M. J., Furbee C. S., Muller M. T., Bazett-Jones D. P. 1996. Topoisomerase II α is associated with the mammalian centromere in a cell cycle- and species-specific manner and is required for proper centromere/kinetochore structure. *J. Cell Biol.* 134 : 1097—1107.

Sheval E. V., Dudnik O. A., Abramchuk S. S., Polyakov V. Y. 2009. Perichromosomal layer proteins associate with chromosome scaffold and nuclear matrix throughout the cell cycle. *Биол. мембраны.* 26 : 126—142.

Sheval E. V., Polyakov V. Y. 2006. Visualization of the chromosome scaffold and intermediates of loop domain compaction in extracted mitotic cells. *Cell Biol. Int.* 30 : 1028—1040.

Sheval E. V., Prusov A. N., Kireev I. I., Fais D., Polyakov V. Yu. 2002. Organization of higher-level chromatin structures (chromomere, chromonema and chromatin block) examined using visible light-induced chromatin photo-stabilization. *Cell Biol. Int.* 26 : 587—591.

Tan J. H., Wooley J. C., LeSturgeon W. M. 2000. Nuclear matrix-like filaments and fibrogranular complexes form through the rearrangement of specific nuclear ribonucleoproteins. *Mol. Biol. Cell.* 11 : 1547—1554.

Tsutsui K. M., Sano K., Tsutsui K. 2005. Dynamic view of the nuclear matrix. *Acta Med. Okayama.* 59 : 113—120.

Поступила 31 VIII 2009

NUCLEAR MATRIX ORGANIZATION OF THE CHROMOCENTERS IN CULTURED MURINE FIBROBLASTS

E. V. Sheval, V. Y. Polyakov

A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University
and Institute of Agricultural Biochemistry, Moscow;
e-mail: sheval_e@genebee.msu.su

In the current work, the structural organization of nuclear matrix of pericentromeric heterochromatin blocks (chromocenters) inside cultured murine fibroblasts was investigated. After 2 M NaCl extraction without DNase I treatment, chromocenters were extremely swelled, and it was impossible to detect them using conventional electron microscopy. Using immunogolding with anti-topoisomerase II α antibody, we demonstrated that resi-

dual chromocenters were subdivided into numerous discrete aggregates. After 2 M NaCl extraction with DNase I treatment, the residual chromocenters appeared as a dense meshwork of thin fibers, and using this feature, the residual chromocenters were easily distinguished from the rest of nuclear matrix. After extraction with dextran sulfate and heparin, the chromocenters were decondensed, and chromatin complexes having rosette organization (central core from which numerous DNA fibers radiated) were seen. Probably, the appearance of these rosettes was a consequence of incomplete chromatin extraction. Thus, the nuclear matrix of pericentromeric chromosome regions in cultured murine fibroblasts differs morphologically from the rest of nuclear matrix.

Key words: nuclear matrix, pericentromeric heterochromatin blocks, murine fibroblasts.
