

## ЯДЕРНЫЙ БЕЛКОВЫЙ МАТРИКС ГИГАНТСКИХ ЯДЕР *CHIRONOMUS PLUMOSUS* ОПРЕДЕЛЯЕТ СТРОЕНИЕ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ

© М. С. Макаров, Ю. С. Ченцов

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова;  
электронный адрес: mcsimtc@yandex.ru, yuchentsov@mail.ru

Гигантские ядра слюнных желез *Chironomus plumosus* подвергали *in situ* процедуре по выявлению ядерного белкового матрикса (ЯБМ), которая включает в себя обработку детергентом, 2 М NaCl и нуклеазами. Было показано, что в случае предварительной стабилизации негистоновых белков 2 мМ CuCl<sub>2</sub> тело политенной хромосомы сохраняет свою морфологическую целостность и дисковый рисунок даже после удаления всех гистонов и ДНК. ЯБМ политенных хромосом можно наблюдать как под световым, так и под электронным микроскопом; при этом в ядре не выявляется никаких межхроматиновых фибриллярно-гранулярных структур, за исключением периферической ламины. Методом иммуноцитохимии удалось выявить в составе ЯБМ политенных хромосом мажорные негистоновые белки (топоизомеразу П $\alpha$  и SMC 1) и РНК-компоненты. Кроме того, в гигантских ядрах личинок ранних стадий наблюдается включение BrDU, показывающее участки синтеза ДНК, которые также связаны с ЯБМ политенных хромосом. Таким образом, ЯБМ гигантских ядер *Ch. plumosus* обладает всеми свойствами ЯБМ обычных интерфазных ядер и при этом определяет специфическую структуру политенной хромосомы.

Ключевые слова: политенная хромосома, негистоновые белки, ядерный белковый матрикс, стабилизация, топоизомераза П $\alpha$ , SMC 1.

В интерфазных ядрах, обработанных неионными детергентами, растворами NaCl высокой концентрации и нуклеазами (Збарский, Дебов, 1951; Георгиев, Ченцов, 1960, 1963; Berezney, 1974), можно выявить остаточную структуру, которая повторяет общие очертания ядра и включает в себя периферическую ламину, остаточное ядрышко и внутреннюю гранулярно-фибрилярную сеть (Berezney, Coffey, 1976, 1977). Эта структура была названа ядерным белковым матриксом (ЯБМ), так как ее главным компонентом являются негистоновые белки. Также в состав ЯБМ входит небольшое количество ДНК, РНК и липидов (Berezney, Coffey, 1977).

В интерфазных ядрах белки ЯБМ связываются с особыми участками ДНК — MARs (matrix associated regions). MARs расположены в тех участках хромосом, которые либо контактируют с периферической ламинной (например, центромеры и теломеры), либо находятся в основании хроматиновых петель (Разин и др., 1980; Яровая, Разин, 1983). Таким образом, ЯБМ участвует в трехмерной организации интерфазного ядра. Первоначально считалось, что ЯБМ представляет собой прочный внутриядерный каркас — скелет (Георгиев, Ченцов, 1963), однако впоследствии было показано, что структура выявляемого ЯБМ очень лабильна и сильно зависит от условий получения препарата (Okada, Comings, 1980; Lebkowski, Laemmli, 1982; Lewis, Laemmli, 1982; Strick et al., 2001), т. е. ЯБМ является весьма динамичным образованием. Показано, что участки инициации репликации и транскрипции, с которыми белки ЯБМ прочно связаны (Разин и др., 1985, 1986), изменяют свою локализацию в ядре (Hozak et al., 1994), что говорит о переорганизации элементов ЯБМ

в ходе работы ядра. В химическом отношении белки ЯБМ представляют собой весьма разнородную группу, насчитывающую свыше 100 различных типов белков (Zbarsky, 1998). Некоторые из них являются мажорными компонентами ЯБМ, т. е. присутствуют во всех ядрах независимо от типа клеток. К таким белкам, в частности, относят топоизомеразу П $\alpha$  (Halligan et al., 1984; Earnshaw et al., 1985) и белки группы SMC (Hirano, Mitchison, 1994; Saitoh et al., 1994). Таким образом, ЯБМ играет важную роль в организации интерфазного ядра. Однако детально изучить структуру ЯБМ в отдельно взятой интерфазной хромосоме не удастся, так как в обычных интерфазных ядрах хромосомы морфологически неразличимы, и на препаратах, подвергшихся процедуре выявления ЯБМ, невозможно выявить ЯБМ одной отдельно взятой хромосомы.

Решить эту проблему можно, используя особый тип интерфазных ядер, внутри которых содержатся гигантские политенные хромосомы (Balbiani, 1881). Политенные хромосомы представляют собой поперечно исчерченные структуры, образованные многократно удвоенными сестринскими хроматидами (Painter, 1934; Кикнадзе, 1972; Жимулев, 1992), поэтому они очень хорошо различимы даже при небольшом увеличении.

Нашей задачей было изучить ЯБМ и его отдельные компоненты в ядрах с политенными хромосомами, используя классический метод выявления ЯБМ (Berezney, 1974) и метод предварительной стабилизации негистоновых компонентов (Lebkowski, Laemmli, 1982) с применением световой и электронной микроскопии.

## Материал и методика

Объект. Исследовали слюнные железы личинок *Chironomus plumosus* (forma larvae) 1-го возраста (мелкий мотыль), а также 3-го и 4-го возрастов (крупный мотыль). Личинок, обернутых во влажную марлю, держали в чашках Петри при 4 °С, промывая каждые 3—4 сут остуженной кипяченой или отстоявшейся водой. Железы получали путем удаления головной капсулы личинки и выделения их в капле гемолимфы. При выделении железы личинок содержали в физиологическом растворе для беспозвоночных. Для закрепления желез на предметном стекле использовали метод, разработанный Абумуслимовым (1991): железы переносят пипеткой на чистое предметное стекло, накрывают покровным стеклом, завернутым в пленку (Parafilm, США), и придавливают грузиком массой 25—30 г. Распластанные таким образом железы прочно закрепляются на предметном стекле.

Получение препарата ЯБМ (Berezney, 1974). В качестве детергента использовали 1%-ный раствор Тритона X-100, 0.1 М NaCl в PBS, в котором железы держали 20 мин. Для удаления гистона H1 железы обрабатывали раствором 0.6 М NaCl в PBS в течение 20 мин. Для удаления всех гистонов использовали раствор 2 М NaCl в PBS в течение 20 мин. ДНК удаляли с помощью ДНКазы I (Sigma, США) (250 мкг/мл) в PBS при 37 °С в течение 15 мин.

Получение препарата ЯБМ стабилизированных ядер. Железы обрабатывали 1%-ным раствором тритона X-100 в присутствии 2 мМ CuCl<sub>2</sub> в PBS в течение 20 мин. Гистон H1 удаляли с помощью 0.6 М NaCl в присутствии 2 мМ CuCl<sub>2</sub> в PBS в течение 20 мин. Для удаления всех гистонов использовали раствор 2 М NaCl, 2 мМ CuCl<sub>2</sub> в PBS в течение 20 мин. ДНК удаляли с помощью ДНКазы I (Sigma, США) (250 мкг/мл) в присутствии 2 мМ CuCl<sub>2</sub> в PBS в течение 15 мин.

Микроскопия. Препараты фиксировали 3.7%-ным раствором параформальдегида и просматривали в микроскопе системы AxioVert 100 (Карл Цейс, Германия) как в фазово-контрастном режиме (об. 63×1.25), так и при проведении иммунофлуоресцентных исследований. В некоторых случаях использовали окраску на общий белок красителем бриллиантовым синим (Рена, 1980), при этом железы, фиксированные 2.5%-ным раствором глутаральдегида в течение 20 мин, окрашивали 0.1%-ным раствором красителя из расчета 1—2 капли на железу в течение 20 мин.

Окраска на ДНК — флуорохром DAPI (Sigma, США): фиксированные 2.5%-ным раствором глутаральдегида железы обрабатывали в течение 2 мин раствором DAPI (5 мг/мл) по 100 мкл на железу, после чего отмывали буферным раствором PBS и заключали в физиологический раствор под покровное стекло. Для совместного выявления ДНК и РНК использовали краситель акридиновый оранжевый: 0.1%-ный раствор красителя в дистиллированной воде разводили физиологическим раствором для насекомых в соотношении 1 : 40 000 и окрашивали 20 мин. Препараты просматривали под объективом 63×1.25 со светофильтром № 488002 (максимум пропускания 365 нм).

Для выявления топоизомеразы Pα, ламина B1 и субъединицы когезина SMC 1 использовали мышиные антитела к этим белкам (Sigma, США). Перед обработкой антителами железы фиксировали 3.7%-ным раствором параформальдегида в PBS в течение 20 мин, затем клетки отмывали 3 раза по 5 мин в растворе PBS. Для иммунохи-

мического определения локализации белков ЯБМ клетки обрабатывали в течение 40 мин при 37 °С первичными антителами к данным белкам, разведенными в PBS (MP Biomedicals, Inc., Германия), содержащем 0.1 % Tween 20 (MP Biomedicals, Inc., Германия) и 1 % BSA (Sigma, США), в соотношении 1 : 50. Затем клетки обрабатывали вторичными антителами, мечеными FITC (Amersham Life Science, США), разведенными тем же раствором в соотношении 1 : 75, при 37 °С в течение 30 мин.

Для выявления начальных точек репликации использовали антитела к бромдезоксисуридину (BrDU). Готовили 0.1 М раствор BrDU на физиологическом буфере для насекомых и обрабатывали им выделенные железы личинок 1-го возраста при 25 °С в течение 24 ч из расчета 200 мкл на железу. Затем железы фиксировали 3.7%-ным параформальдегидом в течение 20 мин, обрабатывали 1 N раствором HCl при 4 °С в течение 10 мин и 2 N HCl при 37 °С в течение 20 мин. Окрашивали в течение 40 мин при 37 °С антителами к BrDU (Amersham Life Science, США), разведенными в PBS (MP Biomedicals, Inc., Германия), содержащем 0.1 % Tween 20 (MP Biomedicals, Inc., Германия) и 1 % BSA (Sigma, США), в соотношении 1 : 50. Препараты просматривали со светофильтром FITC № 488010 (максимум пропускания 510 нм).

Электронная микроскопия. Для электронной микроскопии все процедуры выполняли на покровных стеклах. После проведения всех обработок слюнные железы фиксировали 2.5%-ным раствором глутаральдегида на физиологическом растворе для беспозвоночных в течение 3 ч. Затем проводили постфиксацию 1%-ным раствором OsO<sub>4</sub> в течение 3 ч и подвергали стандартной процедуре обезвоживания: 40%-ный этанол (2 ч)—60%-ный этанол (2 ч)—уранил-ацетат (на ночь)—96%-ный этанол (2 ч)—100%-ный этанол (1 ч)—ацетон (30 мин)—ацетон (30 мин). Затем препараты заключали в смесь Эпона и Аралдита. После заливки снимали покровные стекла с помощью плавиковой кислоты. Ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме Reichert-Jung Ultracut E (Германия), предварительно ориентируя плоскость среза с помощью пирамита Reichert-Jung. Ультратонкие срезы окрашивали по Рейнольдсу и просматривали в электронном микроскопе (Hitachi HU-11В, Япония).

## Результаты

В исходных гигантских ядрах слюнных желез хорошо видны политенные хромосомы с поперечной исчерченностью. В фазовом контрасте и при окрашивании DAPI отчетливо выявляется дисковый рисунок хромосом (рис. 2, а; 3, а, а'). При удалении гистона H1 с помощью 0.6 М NaCl хромосомы набухают, однако сохраняют морфологическую обособленность и элементы дискового рисунка. Это изменение является обратимым: если после удаления гистона H1 гигантские ядра вновь поместить в изотонический раствор, то хромосомы возвращают прежнюю толщину и дисковый рисунок становится более выраженным. Удаление всех гистонов 2 М раствором NaCl приводит к тому, что тела политенных хромосом и ядрышко становятся неразличимы в фазовом контрасте и при окрашивании DAPI. Окраска DAPI показывает, что ДНК диффузно распределена по всему ядру. При суммарной обработке ядер детергентом, 2 М NaCl и ДНКазой хромосомные элементы ЯБМ не видны в фазовом контрасте: не удается выявить ни внутреннюю фибриллярную сеть, ни остаточ-

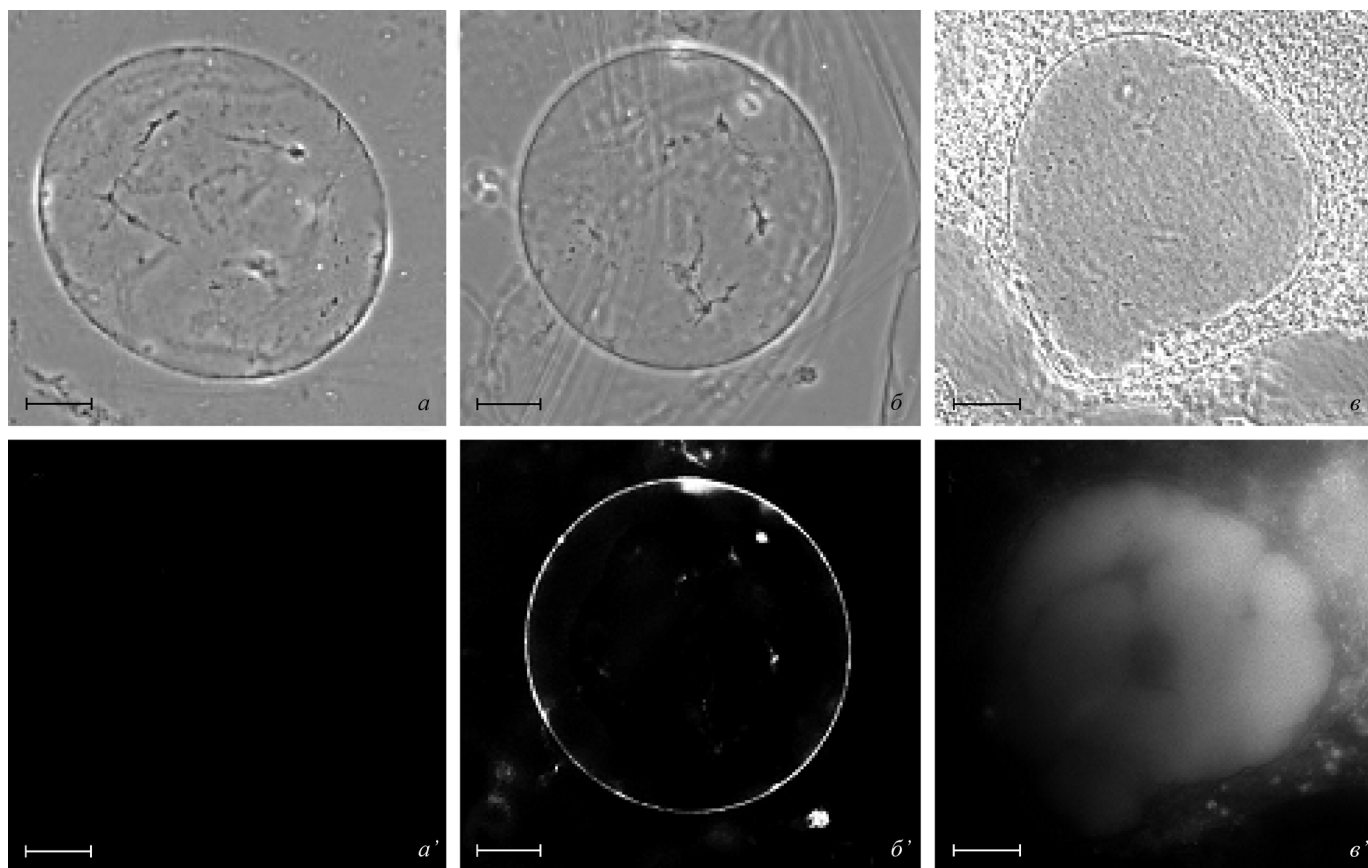


Рис. 1. Гигантские ядра слюнных желез *Chironomus plumosus*, обработанные детергентом, 2 М NaCl и ДНКазой. *a—в* — фазовый контраст; *a'* — окраска DAPI, *б'* — выявление ламина B1, *в'* — выявление SMC1. Масштабные отрезки — 20 мкм.

ное ядрышко (рис. 1, *a—в*). В люминесцентном микроскопе свечения ДНК тоже не наблюдается (рис. 1, *a'*).

Выявление периферической ламина с помощью антител к ламину B1 показывает, что ламинальная часть ЯБМ распределена по периферии ядра как в исходных ядрах с полным набором гистонов, так и после удаления всех гистонов и ДНК и не входит в состав политенных хромосом (рис. 1, *б'*).

Стабилизация негистоновых белков. Предварительная стабилизация негистоновых белков с помощью 2 мМ раствора  $\text{CuCl}_2$  не вызывает изменений в морфологии политенной хромосомы: в фазовом контрасте и при окрашивании DAPI отчетливо видны тела хромосом и их исчерченность (рис. 2, *a, б*). При удалении из стабилизированных ядер гистона H1 с помощью 0.6 М NaCl в фазовом контрасте видно, что политенные хромосомы морфологически различимы и сохраняют дисковый рисунок, при этом они не набухают в отличие от хромосом, обработанных 0.6 М NaCl без добавления 2 мМ  $\text{CuCl}_2$ .

После удаления всех гистонов с помощью 2 М NaCl вид ядер, предварительно стабилизированных 2 мМ  $\text{CuCl}_2$ , существенно отличается от того, что наблюдалось без стабилизации. В данном случае под фазовым контрастом видны тела хромосом с элементами дисковой исчерченности, которые не удается выявить в ядрах, не обработанных предварительно 2 мМ  $\text{CuCl}_2$ . Окраска DAPI при этом выявляет дисковый рисунок хромосом, а не распределена диффузно по ядру, как в случае отсутствия предварительной стабилизации. Это заметное различие сохраняется и при последующем удалении ДНК: в ядрах, предварительно стабилизированных 2 мМ  $\text{CuCl}_2$ , после об-

работки 2 М NaCl и ДНКазой в фазовом контрасте можно видеть тело хромосомы с элементами дисковой исчерченности (рис. 2, *в; 3, в*), при том что ядра не окрашиваются с помощью DAPI (рис. 3, *в'*). Поскольку были удалены гистоны и ДНК, можно сказать, что на рис. 2, *в* и 3, *в* мы видим тело хромосомы, образованное только остаточными негистоновыми белками — белками ядерного матрикса.

Окраска препаратов ЯБМ стабилизированных политенных хромосом с помощью бриллиантового синего по методу Пена. Для подтверждения данных, полученных при наблюдении под фазово-контрастным микроскопом, была применена окраска на общий белок бриллиантовым синим по методу Пена. Можно отметить, что морфология таких хромосом сходна с той картиной, которая наблюдается в фазовом контрасте. В исходных хромосомах отчетливо выявляется дисковый рисунок (рис. 2, *г*). При стабилизации ядер 2 мМ  $\text{CuCl}_2$  морфология хромосом не меняется (рис. 2, *д*); при обработке 2 М NaCl и ДНКазой стабилизированные хромосомы набухают значительно меньше, чем без предварительной стабилизации, тело хромосомы и элементы дискового рисунка различимы (рис. 2, *е*).

Электронная микроскопия. Электронно-микроскопическое исследование политенных хромосом позволяет увидеть картины, схожие с теми, что наблюдали в фазовом контрасте. Под электронным микроскопом исходные политенные хромосомы хорошо различимы, отчетливо видны дисковые и междисковые участки (рис. 2, *ж*). При стабилизации заметных изменений в структуре хромосом не происходит, за исключением небольшого уплотне-

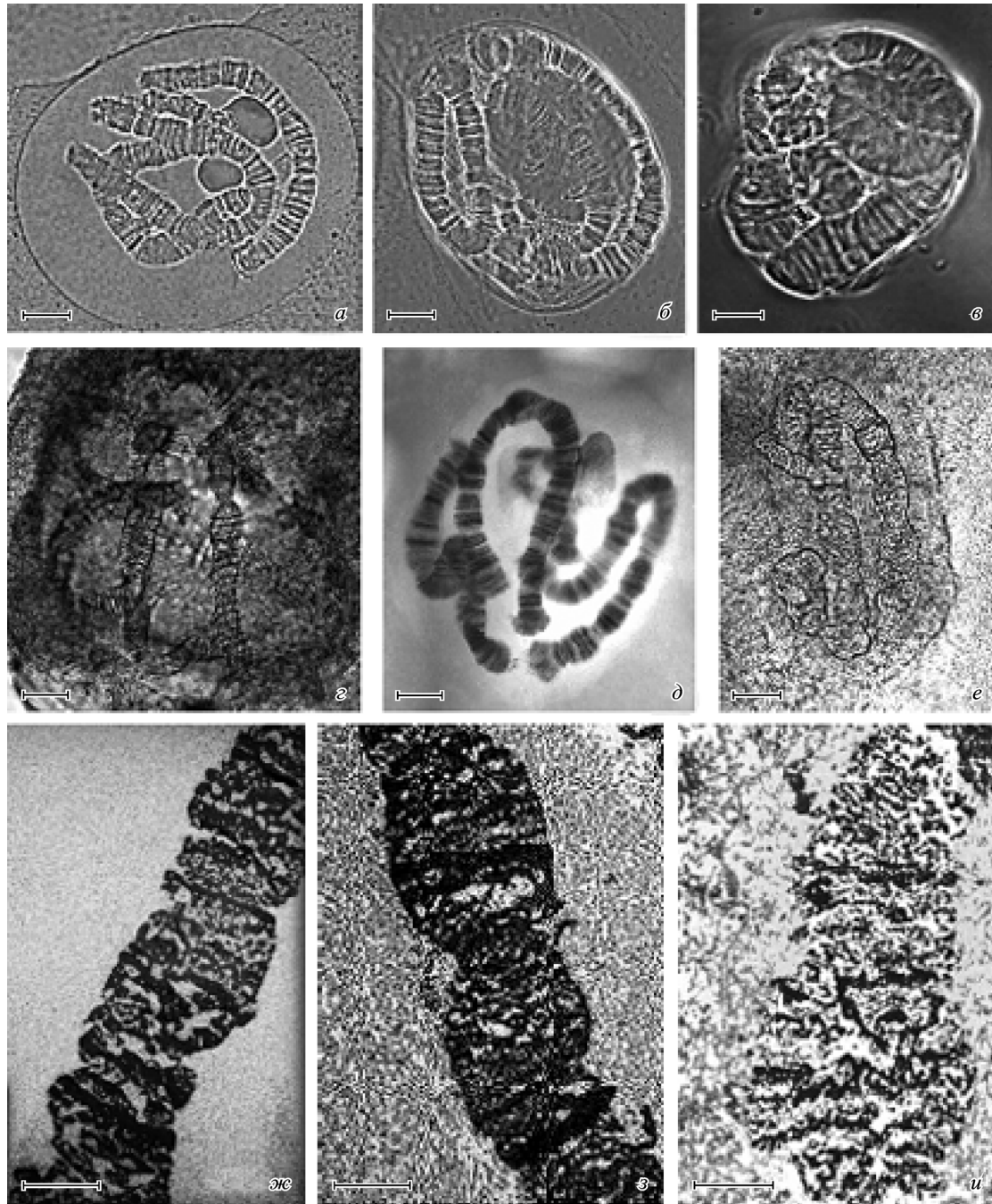


Рис. 2. Выявление ядерного белкового матрикса в стабилизированных гигантских ядрах *Chironomus plumosus*.

1-й ряд — фазовый контраст, 2-й ряд — окраска на общий белок по методу Пена (масштабные отрезки — 20 мкм), 3-й ряд — электронная микроскопия (масштабные отрезки — 2 мкм); а, з, ж — исходные гигантские ядра; б, д, з — ядра, предварительно стабилизированные 2 мМ  $\text{CuCl}_2$ ; в, е, и — ЯБМ стабилизированных гигантских ядер.

ния хромосомного материала; при этом специфическое строение политенных хромосом сохраняется (рис. 2, з).

На рис. 2, и мы видим ультратонкий срез препарата ЯБМ, где отчетливо выявляется тело хромосомы с элементами дисковой исчерченности. При этом в межхромосомных районах гигантского ядра не выявляется никаких структур, за исключением периферической ламины. Таким образом, белки ЯБМ гигантских ядер не образуют внутренней фибриллярной сети (как в обычных интерфазных ядрах), а целиком входят в состав тела политенной хромосомы.

Окраска акридиновым оранжевым. При окрашивании исходных гигантских ядер акридиновым оранжевым в люминесцентном микроскопе видно двойное свечение ДНК и РНК. Свечение ДНК отчетливо выявляет тело хромосомы и ее дисковый рисунок, а свечение РНК очень интенсивно выявляет междисковые участки и ядрышко (рис. 4, а'). На препаратах ядерного белкового матрикса стабилизированных ядер свечение ДНК не выявляется, однако можно видеть красное свечение РНК, диффузно распределенное по телу хромосомы (рис. 4, б'). При обработке РНКазой свечение исчезает.

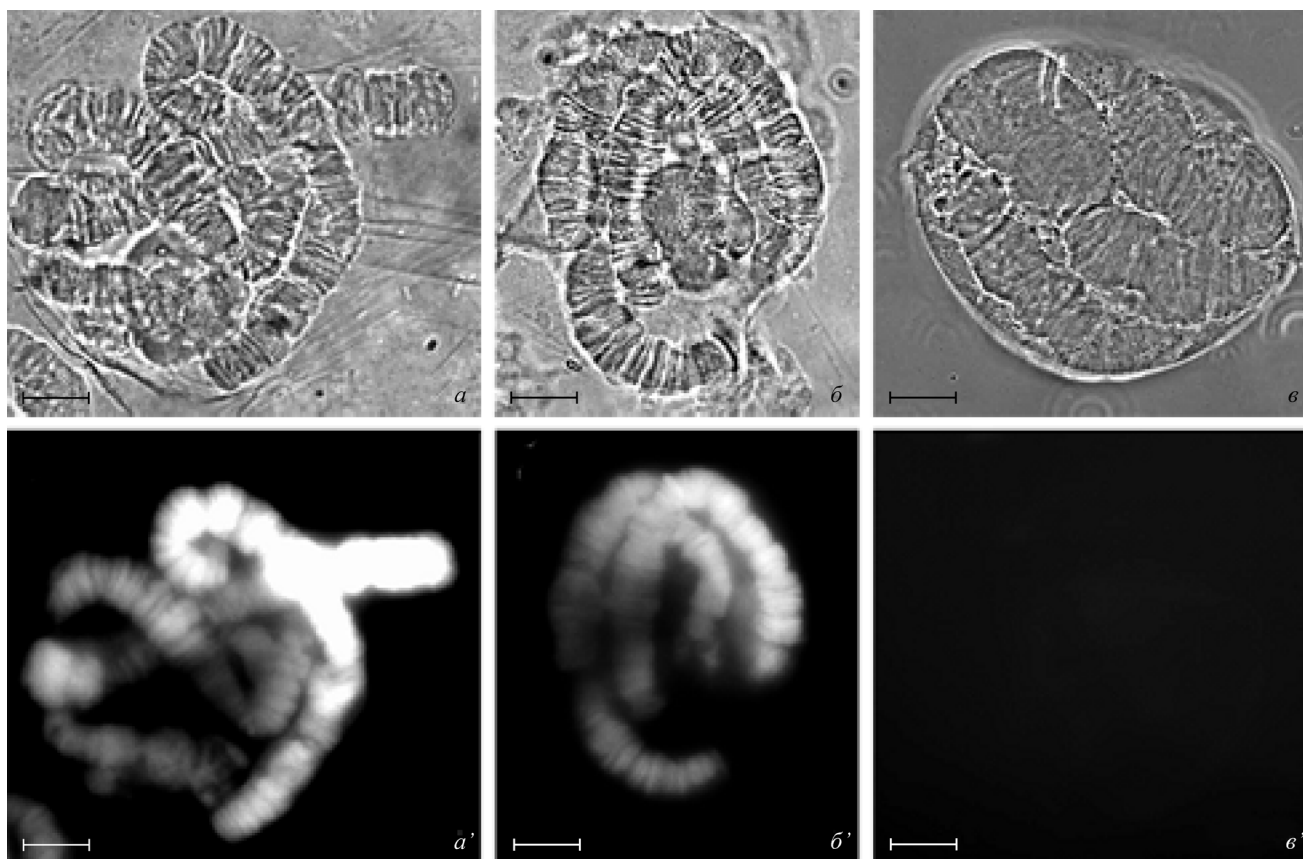


Рис. 3. Выявление ДНК в политенных хромосомах.

*a–v* — фазовый контраст; *a'–v'* — окраска DAPI; *a, a'* — исходные ядра; *b, b'* — ядра, стабилизированные 2 мМ  $\text{CuCl}_2$ ; *v, v'* — ЯБМ стабилизированных гигантских ядер. Масштабные отрезки — 20 мкм.

Распределение антител к BrDU. В гигантских ядрах личинок 1-го возраста (длина личинки  $\leq 7\text{--}8$  мм) степень политенизации еще не достигла максимального значения, поэтому внутри них продолжается синтез ДНК. Мы выявляли точки начала репликации и их возможную связь с ЯБМ с помощью BrDU. В исходных гигантских ядрах личинок 1-го возраста в люминесцентном микроскопе можно выявить множество светящихся зон, распределенных по всей длине хромосомы. Совместное окрашивание антителами к BrDU и топоизомеразе  $\text{II}\alpha$  показывает, что участки включения BrDU расположены главным образом в дисках, хотя могут присутствовать и в междисковых районах (рис. 5, *a*). Кроме того, наблюдается интенсивное свечение в зоне ядрышка, не выявляемое с помощью антител к топоизомеразе  $\text{II}\alpha$ . На препаратах ЯБМ стабилизированных ядер свечение антител к BrDU выражено слабее, чем в исходных ядрах, однако тоже присутствует. На рис. 5, *b* видно, что светящиеся зоны распределены по всему остаточному телу хромосомы, встречаясь как в дисках, так и в междисках. При этом район ядрышка не выявляется.

Локализации отдельных белков ЯБМ в стабилизированных политенных хромосомах. В работе использовали антитела к топоизомеразе  $\text{II}\alpha$  и белку SMC 1. Было показано, что распределение антител к этим белкам повторяет дисковый рисунок хромосом в норме (рис. 6, *a'*; 7, *a'*), при стабилизации (рис. 6, *b'*; 7, *b'*) и при получении стабилизированного ядерного белкового матрикса: в люминесцентном микроскопе отчет-

ливо выявляются тело хромосомы и дисковый рисунок даже после удаления всех гистонов и ДНК (рис. 6, *в'*; 7, *в'*). Следовательно, белки топоизомеразы  $\text{II}\alpha$  и SMC 1 являются неотъемлемыми компонентами ЯБМ политенных хромосом.

Оказалось, что можно выявить тело хромосомы после удаления всех гистонов и ДНК даже без использования стабилизирующего раствора 2 мМ  $\text{CuCl}_2$ . При окрашивании гигантских ядер, обработанных 2 М NaCl и ДНКазой в отсутствие 2 мМ  $\text{CuCl}_2$ , тела хромосом не видны в фазовом контрасте, однако различимы при люминесценции антител к SMC 1. Антитела к когезиновой субъединице SMC 1 выявляют тела морфологически обособленных хромосом (рис. 1, *в'*). При этом тело каждой хромосомы набухло и лишено дискового рисунка.

## Обсуждение

Политенные хромосомы представляют собой интерфазную форму хроматина, поэтому исследование ЯБМ в их составе позволит получить более полное представление об организации интерфазных хромосом в обычных ядрах. Как показали опыты, при удалении гистонов политенная хромосома ведет себя так же, как и интерфазный хроматин диплоидных ядер: происходят набухание и потеря контрастности изображения. При удалении гистона H1 в результате обработки 0.6 М раствором NaCl происходят набухание политенных хромосом и истончение

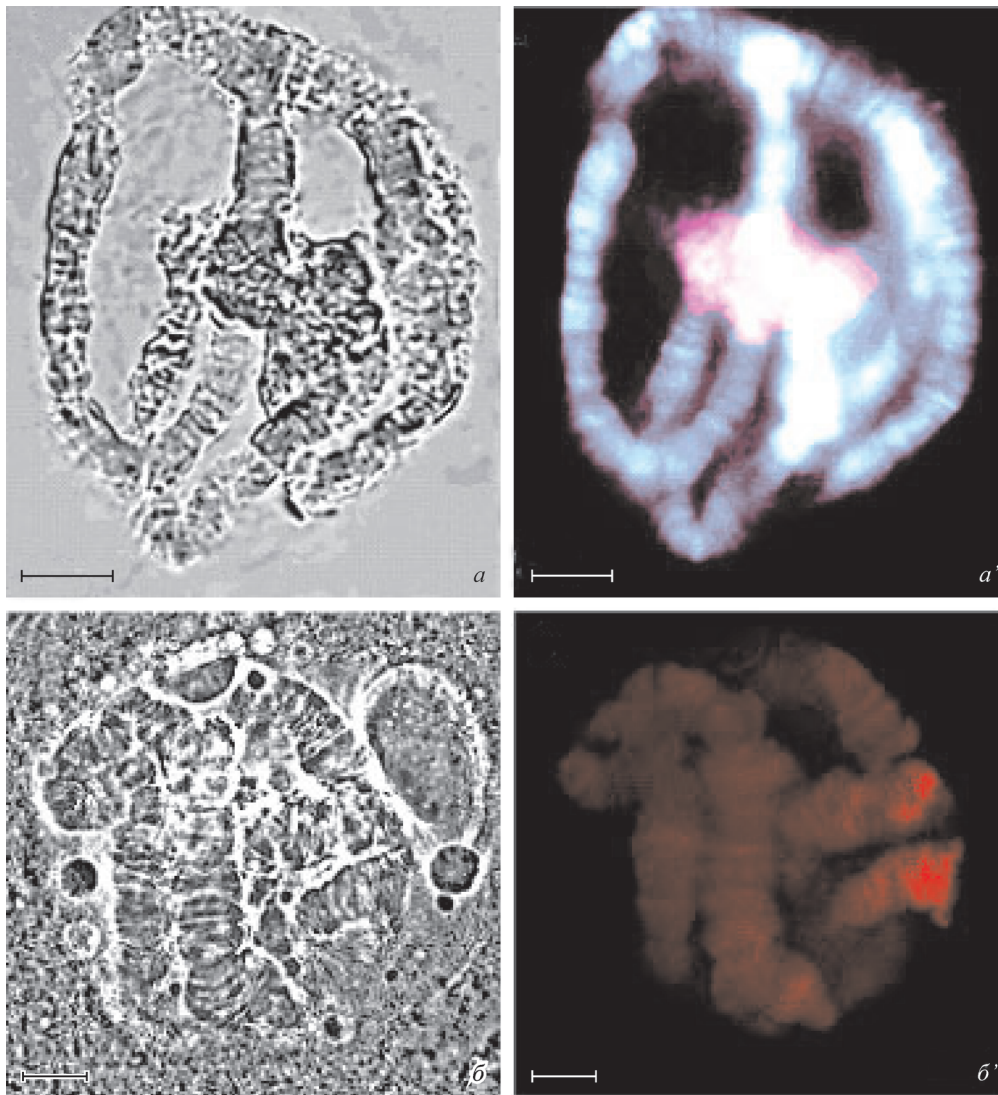


Рис. 4. Гигантские ядра, окрашенные акридиновым оранжевым.

Слева — фазовый контраст, справа — двойное свечение ДНК (синий) и РНК (красный); а, а' — исходные ядра; б, б' — ЯБМ стабилизированных гигантских ядер. Масштабные отрезки — 20 мкм.

рисунка дисков при сохранении целостности тела хромосомы. Но возврат хромосом с удаленным гистонем Н1 в изотонический раствор (0.1 М NaCl) приводит к некоторому сжатию хромосом и восстановлению рисунка дисков, хотя при этом не наблюдается восстановления ядрышка. Это свидетельствует о том, что, по-видимому, гистон Н1 не является необходимым компонентом для сохранения исходной исчерченной структуры политенных хромосом.

Удаление всех гистонов с помощью 2 М раствора NaCl не позволяет наблюдать в фазовом контрасте ни контуры тела хромосомы, ни ее исчерченность, т. е. можно было бы сделать вывод о необходимости наличия полного набора гистонов для поддержания исходной формы политенных хромосом. Однако предварительная стабилизация негистоновых белков с помощью 2 мМ  $\text{CuCl}_2$  сохраняет специфическую структуру политенной хромосомы даже после удаления из нее всех гистонов и ДНК (рис. 2, в; 3, в).

Возникает вопрос: вызывает ли удаление всех гистонов без стабилизации необратимый распад тела политенной хромосомы или же целостность хромосом все-таки

сохраняется? В фазовом контрасте хромосомы, обработанные 2 М NaCl, морфологически неразличимы. Однако использование антител к когезиновой субъединице SMC 1 позволяет выявить тела хромосом в ядрах, обработанных детергентом, 2 М NaCl и ДНКазой в отсутствие 2 мМ  $\text{CuCl}_2$  (рис. 1, в'). Иначе говоря, в подобных ядрах мы видим нестабилизированный ЯБМ: хромосомы морфологически обособлены, однако при этом они набухают и теряют дисковый рисунок. Следовательно, нативные негистоновые белки способны поддерживать структуру политенных хромосом даже без участия стабилизирующего раствора 2 мМ  $\text{CuCl}_2$ .

Добавление к исходным ядрам 2 мМ раствора  $\text{CuCl}_2$  позволяет выявить тело хромосомы после удаления гистонов и ДНК как в фазовом контрасте (рис. 2, в; 3, в), так и при окрашивании гигантских ядер на общий белок (рис. 2, е). Можно предположить, что ионы  $\text{Cu}^{2+}$  способствуют упрочению внутривнутрихромосомной сети, образованной некоторыми из белков ЯБМ. По-видимому, действие ионов  $\text{Cu}^{2+}$  заключается в стабилизации и конденсации неких негистоновых белков, аналогичных когезинам, ко-

Рис. 5. Выявление зон включения BrDU в политенных хромосомах.

*a* — исходные ядра, *б* — ЯБМ стабилизированных гигантских ядер; *красный* — свечение антител к BrDU, *синий* — свечение антител к топоизомеразе IIα. Масштабные отрезки — 20 мкм.

торые сшивают сестринские хроматиды. Поскольку было доказано наличие когезинов в междисках (Markov et al., 2003), можно предположить, что их связывание с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  способствует укреплению исходной формы политенных хромосом.

Показано, что в диплоидных ядрах ионы  $\text{Cu}^{2+}$  связывают металлопротеиды и другие негистоновые белки, способствуя упрочению организации скелетной сети ядра и, в частности, поддержанию структуры метафазной хромосомы (Lebkowski, Laemmli, 1982; Lewis, Laemmli, 1982). Наши результаты показали, что действие ионов  $\text{Cu}^{2+}$  также приводит к стабилизации тела хромосомы; таким образом, можно говорить о том, что опорные функции негистоновых белков политенных хромосом аналогичны функциям ЯБМ обычных интерфазных ядер.

Антитела к мажорным негистоновым компонентам ЯБМ (топоизомеразе IIα и SMC 1) выявляют эти белки лишь в составе остаточных тел хромосом, повторяя дисковый рисунок. Это говорит о том, что элементы ЯБМ, участвующие в организации интерфазной хромосомы, расположены исключительно внутри хромосом и не образуют никаких межхроматиновых структур. Электронно-микроскопический анализ подтверждает данное предположение: в гигантских ядрах со стабилизирован-

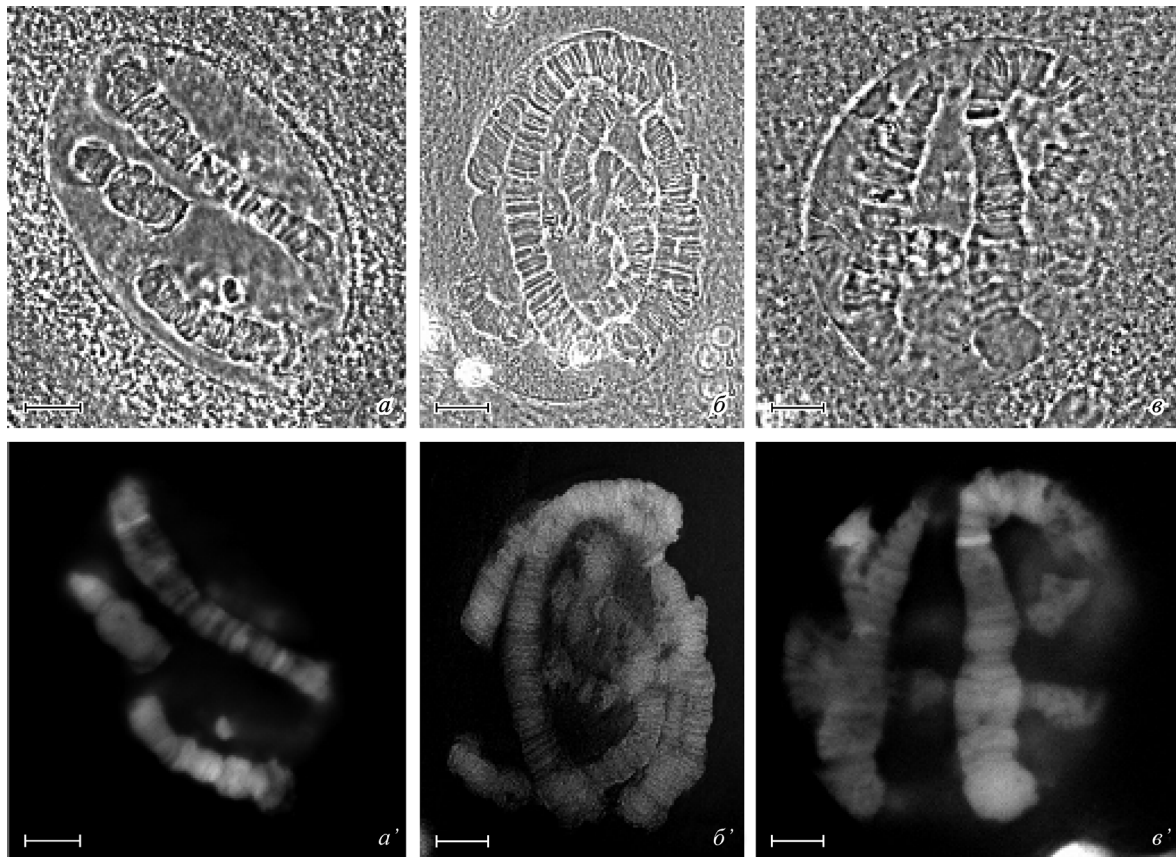
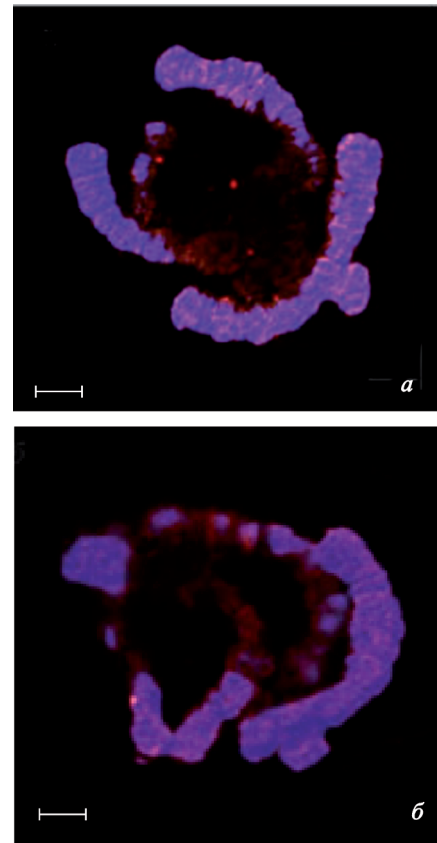


Рис. 6. Локализация топоизомеразы IIα в гигантских ядрах.

*a–в* — фазовый контраст; *a'–в'* — свечение антител к топоизомеразе IIα; *a, a'* — исходные ядра; *б, б'* — ядра, стабилизированные 2 мМ  $\text{CuCl}_2$ ; *в, в'* — ЯБМ стабилизированных гигантских ядер. Масштабные отрезки — 20 мкм.

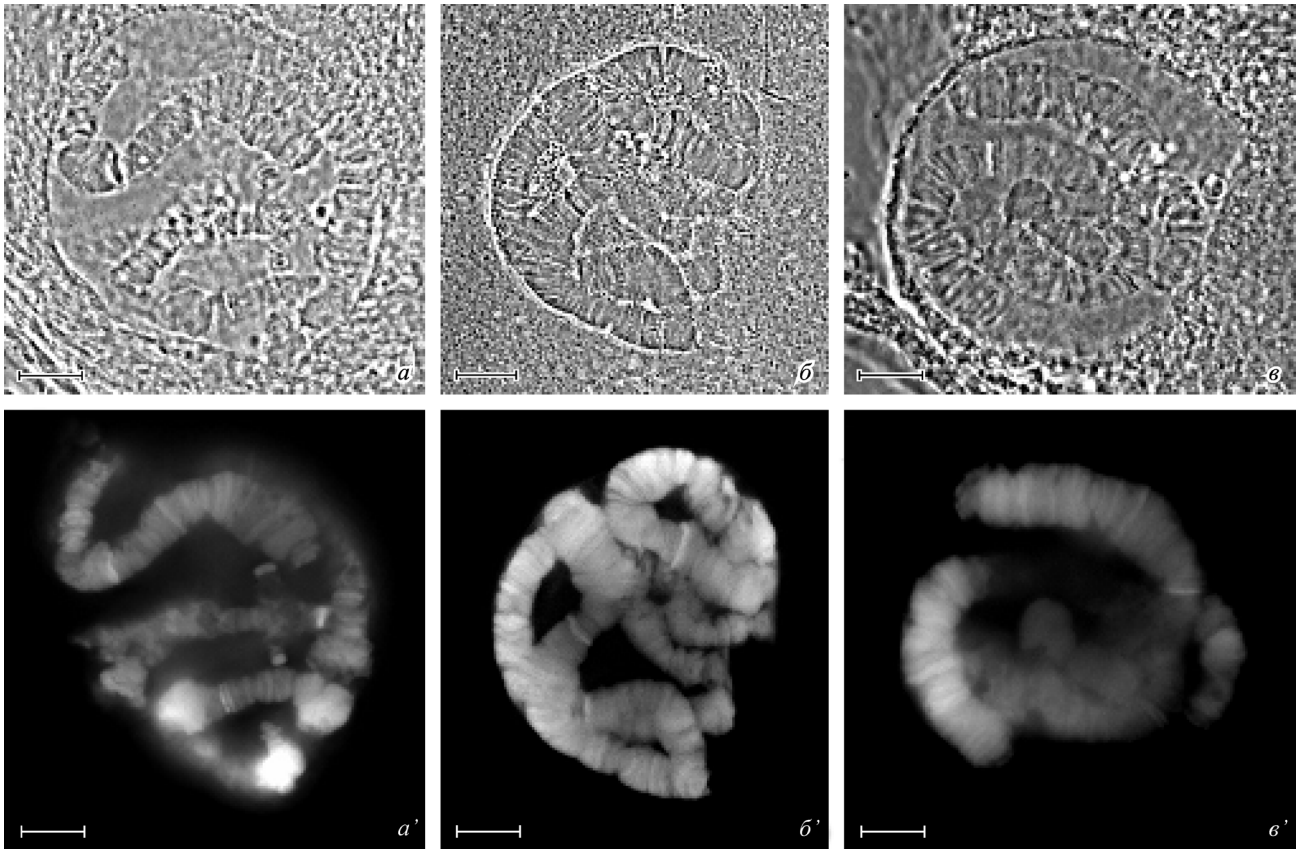


Рис. 7. Локализация когезиновой субъединицы SMC1 в гигантских ядрах.

*a—в* — фазовый контраст; *a'—в'* — свечение антител к SMC1; *a, a'* — исходные ядра; *б, б'* — ядра, стабилизированные 2 мМ CuCl<sub>2</sub>; *в, в'* — ЯБМ стабилизированных гигантских ядер. Масштабные отрезки — 20 мкм.

ным матриксом (рис. 2, *и*) мы видим только остаточное тело политенной хромосомы и периферическую ламину. Следовательно, та структура ЯБМ, которая в обычных интерфазных ядрах выявляется в виде внутренней фибриллярной сети, в гигантских ядрах входит в состав только политенных хромосом и не присутствует в межхромосомном пространстве.

При этом внутри некоторых дисков видны хромомеры, распределенные по рисунку дисков, как в фазовом контрасте, так и при выявлении мажорных негистоновых белков с помощью антител (рис. 6, *в, в'*). По-видимому, в световой микроскоп мы наблюдаем не отдельные хромомеры (их число внутри одного диска должно равняться числу сестринских хроматид), а комплексы из хромомеров. Хромомеры выявляются не во всех дисках, что указывает на неоднородность их конденсации. Под фазовым контрастом и при люминесценции антител можно видеть очень плотные диски, сохраняющие свою структуру даже при удалении всех гистонов и ДНК.

Остаточное ядрышко не выявляется в составе ЯБМ политенных хромосом ни под фазовым контрастом, ни под электронным микроскопом, ни при окрашивании на общий белок по методу Пена. Можно предположить, что ядрышко гигантских клеток слюнных желез имеет особую, отличную от обычных интерфазных ядрышек, организацию, при которой негистоновые белки не играют решающей роли в закреплении внутренней структуры. Все же некоторое количество РНК-компонентов в составе ЯБМ сохраняется. При окрашивании препаратов стабилизированного ЯБМ акридиновым оранжевым в люминес-

центном микроскопе наблюдается слабое красное свечение, диффузно распределенное по остаточному телу хромосомы, присутствующее и в дисковых, и в междисковых районах. Это соответствует данным, полученным при исследовании ЯБМ обычных интерфазных ядер, где показано, что в состав ЯБМ входят РНК-компоненты (Vegezney, Coffey, 1977; Разин и др., 1985).

Краситель DAPI не выявляет никаких ДНК-структур в составе стабилизированного ЯБМ политенных хромосом, однако предварительная инкубация желез молодых личинок с BrDU позволяет наблюдать в остаточном теле политенной хромосомы отдельные участки включения BrDU, т. е. участки, связанные с синтезом ДНК. По-видимому, ДНК в местах начала репликации экранируется негистоновыми белками от нуклеазного переваривания. Возможно, выявляемые области включения расположены в глубине тела политенной хромосомы, прочно встроенные в сеть негистоновых белков. У взрослых личинок (3-го и 4-го возрастов) процесс эндорепликации уже завершен, поэтому BrDU не может встроиться в растущую нить ДНК и потому не выявляется в составе политенных хромосом.

Подводя итог, можно сказать, что в ЯБМ политенных хромосом слюнных желез *Chironomus plumosus* присутствуют почти все структурные компоненты, характерные для ЯБМ обычных интерфазных ядер (периферическая ламина, мажорные негистоновые белки, ДНК и РНК, связанные с сетью негистоновых белков). Не выявляется только остаточное ядрышко, очевидно вследствие особой формы организации ядрышка в гигантских ядрах.



Независимо от способа наблюдения (мы использовали фазово-контрастную микроскопию, гистологическую окраску на общий белок и иммуофлуоресценцию) характер выявляемого ЯБМ гигантских ядер остается одинаковым: мы видим образованное негистоновыми белками тело политенной хромосомы с элементами дискового рисунка. По-видимому, именно наличие негистоновых белков ЯБМ является решающим фактором, определяющим специфическую структуру политенных хромосом.

### Список литературы

- Абумуслимов С. С., Надеждина Е. С., Ченцов Ю. С. 1991. Множественные бесцентриолярные центры организации микротрубочек в гигантских клетках слюнных желез *Chironomus singulatus*. Цитология. 33 (12) : 36—40.
- Георгиев Г. П., Ченцов Ю. С. 1960. О структуре клеточного ядра. Экспериментальное электронно-микроскопическое исследование изолированных ядер. ДАН СССР. 132 (3) : 199—202.
- Георгиев Г. П., Ченцов Ю. С. 1963. Об ультраструктурах ядра на основании электронной микроскопии ядер, подвергнутых солевым экстракциям. Биофизика. 8 (1) : 50—56.
- Жимулев И. Ф. 1992. Политенные хромосомы: морфология и структура. Новосибирск: Наука. 478 с.
- Збарский И. В., Дебов А. А. 1951. Белковые фракции интерфазных ядер клеток. Биохимия. 16 (4) : 390—395.
- Кикнадзе И. Н. 1972. Физиологическая организация хромосом. Новосибирск: Наука. 256 с.
- Разин С. В., Бандт Д., Чернохостов В. В. 1986. Прочно связанные с ДНК белки опосредуют прикрепление к ядерному скелету транскрипционно активной фракции ДНК. Молекуляр. биол. 20 (4) : 387—395.
- Разин С. В., Мантьева В. Л., Георгиев Г. П. 1980. Выделение и сравнительная характеристика участков ДНК, прилегающих к структурам остова интерфазного ядра и метафазной хромосомы. Молекуляр. биол. 14 (5) : 223—233.
- Разин С. В., Яровая О. В., Георгиев Г. П. 1985. Связанная с эндогенной матрицей РНК полимеразы II сконцентрирована во фракции ДНК, прилегающей к ядерному скелету, и сохраняет способность к элонгации цепей РНК в препаратах ядерного белкового матрикса. ДАН СССР. 281 (5) : 220—223.
- Яровая О. В., Разин С. В. 1983. Два типа участков прикрепления ДНК к ядерному скелету в клетках асцитной карциномы Эрлиха. Молекуляр. биол. 17 (4) : 303—313.
- Balbani E. G. 1881. Sur la structure du noyau des cellules salivaires chez les larves de *Chironomus*. Zool. Anz. 4 : 637—662.
- Berezney R. 1974. Large-scale isolation of nuclear membranes from bovine liver. Methods in Cell Biol. 1974. 8 : 205—228.
- Berezney R., Coffey D. S. 1976. The nuclear protein matrix: isolation, structure and functions. Adv. Enzyme Reg. 14 : 63—100.
- Berezney R., Coffey D. S. 1977. The nuclear protein matrix: isolation characterization of a framework structure from rat liver nuclei. J. Cell Biol. 73 : 616—637.
- Earnshaw W. C., Halligan B., Cooke C. A., Heck M. S., Liu L. F. 1985. Topoisomerase II is a structural component of mitotic chromosome scaffold. J. Cell Biol. 100 : 1706—1715.
- Halligan B., Small D., Vogelstein B., Hsieh T.S., Liu L. F. 1984. Localization of type II DNA topoisomerase in nuclear matrix. J. Cell Biol. 62 : 335—340.
- Hirano T., Mitchison T. J. 1994. A heterodimeric coiled-coil protein required for mitotic chromosome condensation *in vitro*. Cell 79 : 449—458.
- Hozak P., Jackson D. A., Cook P. R. 1994. Replication factories and nuclear bodies: the ultrastructural characterization of replication sites during cell cycle. J. Cell Biol. 107 : 2191—2202.
- Lebkowski J. S., Laemmli U. K. 1982. Evidence for two levels of DNA folding in histone-depleted HeLa interphase nuclei. J. Mol. Biol. 156 : 309—324.
- Lewis C. D., Laemmli U. K. 1982. Higher-order metaphase chromosome structure: evidence for metalloprotein interactions. Cell 29 : 171—181.
- Markov A. V., Zakharov A. A., Galkin A. P., Strunnikov A. V., Smirnov A. F. 2003. Localization of cohesin complexes of polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* located on interbands. Genetika. 39 : 1203—1211.
- Okada T. A., Comings D. E. 1980. A search for protein cores in chromosomes: is the scaffold an artifact? Amer. J. Hum. Genet. 32 : 814—832.
- Painter T. J. 1934. Nature of giant chromosomes from salivary glands of Diptera. Heredity. 25 : 465—476.
- Penas S. D. 1980. A new technique for the visualization of the cytoskeleton in cultured fibroblasts with Coomassie blue R250. Cell Biol. Intern. Rep. 4 : 149—154.
- Saitoh N., Goldberg I. G., Wood E. R., Earnshaw W. C. 1994. ScII: an abundant chromosome scaffold protein is a member of a family of putative ATPases with an unusual predicted tertiary structure. J. Cell Biol. 127 : 303—318.
- Strick R., Strissel P. L., Gavrilov K., Levi-Setti R. 2001. Cation-chromatin binding as shown by ion microscopy is essential for the structural integrity of chromosomes. J. Cell Biol. 155 : 899—910.
- Zbarsky I. B. 1998. On the history of nuclear matrix manifestation. Cell Res. 8 : 99—103.

Поступила 26 I 2010

## NUCLEAR PROTEIN MATRIX FROM GIANT NUCLEI OF *CHIRONOMUS PLUMOSUS* DETERMINATES POLYTHENE CHROMOSOME ORGANIZATION

M. S. Makarov, Yu. S. Chentsov

M. V. Lomonosov Moscow State University; e-mail: mcsimmc@yandex.ru, yuchentsov@mail.ru

Giant nuclei from salivary glands of *Chironomus plumosus* were treated *in situ* with detergent, 2 M NaCl and nucleases in order to reveal residual nuclear matrix proteins (NMP). It was shown, that preceding stabilization of non-histone proteins with 2 mM CuCl<sub>2</sub> allowed to visualize the structure of polythene chromosomes at every stage of the extraction of histones and DNA. Stabilized NPM of polythene chromosomes maintains their morphology and banding patterns, which is observed by light and electron microscopy, whereas internal fibril net or residual nucleoli are not found. In stabilized NPM of polythene chromosomes, topoisomerase II $\alpha$  and SMC1 retain their localization that is typical of untreated chromosomes. NPM of polythene chromosomes also includes sites of DNA replication, visualized with BrDU incubation, and some RNA-components. So, we can conclude that structure of NPM from giant nuclei is equal to NPM from normal interphase nuclei, and that morphological features of polythene chromosomes depend on the presence of NMP.

Key words: polythene chromosome, non-histone proteins, nuclear protein matrix, stabilization, topoisomerase II $\alpha$ , SMC1.