

## БЕЛКИ ЯДЕРНОГО МАТРИКСА С МОЛ. МАССАМИ 38 И 50 КДА, ТРАНСПОРТИРУЕМЫЕ ХРОМОСОМАМИ В МИТОЗЕ

© М. И. Мурашева, Ю. С. Ченцов

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова;  
электронный адрес: [marinak-m@mail.ru](mailto:marinak-m@mail.ru), [yuchentsov@mail.ru](mailto:yuchentsov@mail.ru)

Иммунофлуоресцентным методом показано, что аутоиммунные сыворотки М68 и К43 связываются с интерфазными ядрами и митотическими хромосомами клеток культуры СПЭВ. Методом иммуноблотинга в сыворотке М68 обнаружены антитела к белку с мол. массой 50 кДа, а в сыворотке К43-антитела к полипептиду с мол. массой 38 кДа. В ядерном белковом матриксе антитела к белку с мол. массой 38 кДа окрашивают только периферию ядрышек интерфазных клеток, а антитела к белку с мол. массой 50 кДа окрашивают как периферию ядрышек, так и все ядро. Это говорит о том, что из всех компонентов ядерного матрикса (ламина, внутренняя белковая сеть, остаточное ядрышко) белок с мол. массой 38 кДа входит в состав периферии остаточных ядрышек, а полипептид с мол. массой 50 кДа не только входит в состав периферии остаточных ядрышек, но и участвует в образовании ядерной белковой сети. Данные белки в интерфазных клетках *in situ* локализовались в ядре, причем один из них (50 кДа) в виде небольших четко очерченных гранул, а второй (38 кДа) в виде ярких мелких гранул на фоне диффузно окрашенного ядра. Оба белка выявляются также по периферии ядрышек в виде сплошного кольца. Во время митоза белок с мол. массой 50 кДа выявляется на периферии хромосом в виде чехла или муфты, а белок с мол. массой 38 кДа располагается на митотических хромосомах в виде отдельных фрагментов и гранул вокруг них. В условиях искусственной деконденсации хромосом антитела к обоим белкам окрашивают интерфазные ядра диффузно, а в митотических клетках локализуются на поверхности набухших хромосом. Белок с мол. массой 50 кДа сохраняет прочную связь с хромосомами как в норме и при гипотонической деконденсации, так и при последующей реконденсации в изотонической среде, в то время как белок с мол. массой 38 кДа при реконденсации частично теряет связь с хромосомой, появляясь в цитоплазме в виде гранул. Из представленных данных можно сделать вывод о том, что белки ядерного матрикса переносятся периферическим хромосомным материалом и могут иметь различную степень ассоциации с периферией хромосом, так же как и основные белки ядрышка, такие как фибрилларин, В-23, нуклеолин и некоторые неядрышковые белки ядерного матрикса.

Ключевые слова: гипотония, иммунохимия, митоз, хромосома, ядерно-белковый матрикс, ядрышко.

Принятые сокращения: ПХМ — периферический хромосомный материал, ЯБМ — ядерный белковый матрикс.

Периферический хромосомный материал (ПХМ) представляет собой поверхностный слой на митотических хромосомах клеток животных и растений (Gautier et al., 1994; Hernandez-Verdun Gautier, 1994; Ченцов, 2000). ПХМ был описан еще в 30-х годах прошлого столетия как компонент, окружающий митотическую хромосому, и получил название хромосомного матрикса (Sharp, 1929). Существовала точка зрения, согласно которой экстрахромосомный материал имеет исключительно ядрышковое происхождение (Nebel, 1932; McClintock, 1934) и представляет собой продукты возобновления синтетической активности хромосом (Lafontaine, 1968). ПХМ, ранее называвшийся «матриksom» митотических хромосом, в 1970-е годы был впервые описан в клетках растений и животных с помощью электронного микроскопа (Ченцов, Поляков, 1974; Бураков и др., 1994). С началом изучения белков иммуноцитохимическим методом было показано, что митотические хромосомы участвуют в переносе в до-

черные клетки как ядрышковых белков, так и белков ядерного матрикса (Hernandez-Verdun, Gautier, 1994). Белки ядрышек, переносимые в составе ПХМ, являются компонентами рибосомных субъединиц, участвуют в процессинге и транспорте рибосомальных компонентов, биогенезе рибосом и транскрипции (Gautier et al., 1994; Medina et al., 1995; Olson, Dunder, 2005). Кроме ядрышковых белков в составе ПХМ обнаруживаются неядрышковые белки. Часть этих белков входит в состав ядерно-белкового матрикса (ЯБМ) интерфазных ядер (Chaly et al., 1984; McKeon et al., 1984; Vega-Salas, Salas, 1996; Dunder et al., 1997; Ченцов и др., 1999; Косых, Ченцов, 2002). ЯБМ — гетерогенный компонент, который выявляется после экстракции из ядра ДНК, РНК и всех гистонов (Zbarsky, Georgiev, 1959; Georgiev, Chentsov, 1962; Berezney, Coffey, 1977). В структурном отношении ЯБМ представлен внутриядерной белковой сетью, остаточными ядрышками и ламинной и играет большое значение в пространствен-

ной организации синтеза ДНК и РНК в интерфазном ядре (Berezney et al., 1995).

В настоящее время найдено большое количество ядрышковых белков, входящих в состав ПХМ, и у многих описаны функции, в то время как неядрышковых белков выявлено значительно меньше, и у большей их части функции остаются невыясненными (Hernandes-Verdun, Gautier, 1994; Ченцов и др., 1999; Косых, Ченцов, 2002; Van Hooser et al., 2005). Вместе с тем невыясненными остаются также природа и химизм связи компонентов ПХМ с поверхностью хромосом. Ранее было показано, что определить стабильность связи ядрышковых и неядрышковых белков с хромосомой можно при помощи искусственной деконденсации (Мухарьямова и др., 1998; Косых, Ченцов, 2002).

В работе использовали аутоиммунные антитела к некоторым новым неядрышковым полипептидам, которые предположительно относятся к белкам ядерного матрикса. Задачей работы явилось исследование иммунофлуоресцентными методами локализации белков в интерфазных ядрах, на митотических хромосомах и в ядерном матриксе, а также определение молекулярных масс этих белков. Для определения стабильности связи этих белков с поверхностью хромосом была изучена их локализация при искусственной деконденсации митотических хромосом во время их набухания и после возврата в исходные изотонические условия.

## Материал и методика

**Клеточная культура.** Работа выполнена на клетках культуры СПЭВ (почка эмбриона свиньи), полученных из Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия) и выращенных в среде 199 с 10 % сыворотки крупного рогатого скота в присутствии гентамицина в концентрации 100 мкг/мл. Клетки культивировали при 37 °С на покровных стеклах в чашках Петри и использовали на 2-е сут после посадки. Хромосомы изучали непосредственно в клетках без предварительного их выделения.

Использовали сыворотки М68 и К43, которые, по предварительным данным, связывались с интерфазными ядрами. Эти сыворотки были получены от пациентов с аутоиммунными заболеваниями (Институт ревматологии, Санкт-Петербург).

**Экспериментальные воздействия.** Для выявления стабилизированного ядерного белкового матрикса из клеток удаляли хроматин, РНП и гистоны по модифицированному методу (Berezney, Coffey, 1977). Клетки обрабатывали лизирующим раствором (50 мМ ТЭА, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.1 мМ PMSF, 1 % Тритона X-100 и 1 мМ CuSO<sub>4</sub>, pH 7.6) в течение 20 мин, затем экстрагировали гистоны (2 мМ NaCl, 5 мМ ЭДТА и 20 мМ ТЭА, pH 7.6) в течение 20 мин и ДНК и РНК с помощью ДНКазы I и РНКазы А (50 мМ ТЭА, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.1 мМ PMSF, 100 мкг/мл ДНКазы I, 100 мкг/мл РНКазы А и 1 мМ CuSO<sub>4</sub>) в течение 20 мин. После такой обработки клетки промывали раствором, содержащим 20 мМ ТЭА и 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, pH 7.6.

Для анализа стабильности связи изучаемых белков ядерного матрикса с поверхностью хромосом клетки подвергали действию гипотонии, приводящей к значительному изменению объема хромосом при их набухании. Такое воздействие может сказаться на степени связи белков ПХМ с митотическими хромосомами, так же как и воз-

ращение клеток из гипотонического в изотонический раствор. Для искусственной деконденсации хромосом *in vivo* в качестве гипотонического раствора использовали 15%-ный раствор Хенкса (Киреев и др., 1988). Клетки инкубировали в этом растворе в течение 10 мин при 37 °С. Затем часть стекол с клетками фиксировали, а другую часть переносили в стандартную среду культивирования и инкубировали в течение 20 мин при 37 °С.

Чтобы сопоставить характер локализации изучаемых белков в контроле и опыте с искусственной деконденсацией хромосом и последующим удалением из клеток РНК, клетки обрабатывали раствором РНКазы А (1 % Тритона X-100 и 100 мкг/мл РНКазы — в растворе Хенкса соответствующей тоничности, pH 7.2) в течение 10 мин.

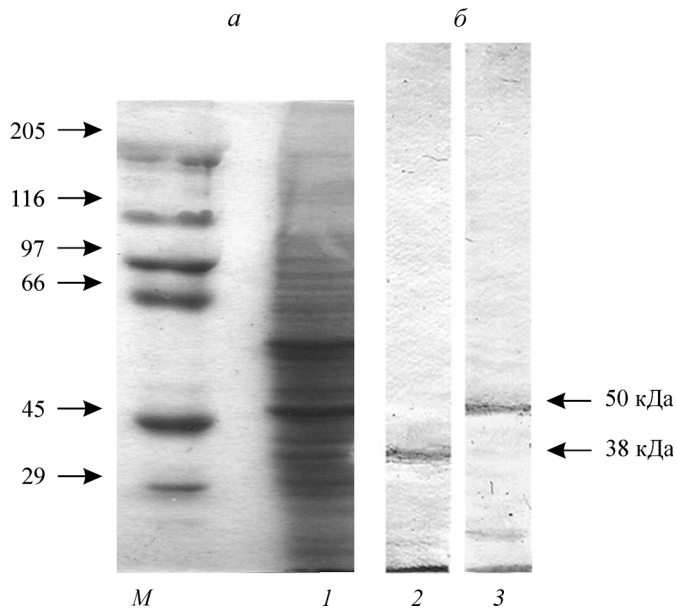
Клетки в контроле и опытах промывали раствором Хенкса соответствующей тоничности, фиксировали холодным (–20 °С) метанолом и проводили иммунофлуоресцентное окрашивание.

**Иммунофлуоресцентное окрашивание.** Перед обработкой аутоиммунными сыворотками клетки отмывали 30 мин раствором PBS, содержащим 0.1 % Твина 20 и 1 % бычьего сывороточного альбумина. Для иммунохимического анализа клетки обрабатывали аутоиммунными сыворотками М68 или К43, разведенными в соотношении 1 : 50 в растворе PBS, содержащим 0.1 % Твина 20 и 1 % бычьего сывороточного альбумина, в течение 40 мин при 37 °С, а затем 3 раза по 5 мин промывали этим же раствором. После этого клетки конъюгировали с кроличьими антителами к иммуноглобулинам человека, меченными ФИТЦ, разведенными тем же раствором в соотношении 1 : 100, при 37 °С в течение 30 мин. В качестве отрицательного контроля при каждом иммунофлуоресцентном окрашивании использовали обработку клеток только вторыми антителами. Для выявления ДНК препараты окрашивали флуорохромом DAPI в концентрации 1 мкг/мл по стандартной методике. Затем препараты промывали и заключали в Moviol.

Препараты просматривали и фотографировали в люминесцентном микроскопе Opton с объективом Neofluar 100×1.25.

**Характеристики аутоиммунных сывороток.** Для характеристики антител аутоиммунных сывороток М68 и К43 использовали метод иммуноблоттинга. Белки разделяли методом ступенчатого градиентного электрофореза в полиакриламидном геле 6—12 % в денатурирующих условиях в системе Лэммли (Laemmli, 1970). Использовали прибор для вертикального электрофореза, находящийся в Институте белка РАН. В качестве маркеров использовали набор белковых метчиков с мол. массами 205, 116, 97.4, 66, 45 и 29 кДа. Для анализа был взят тотальный белок клеток культуры СПЭВ. При проведении иммуноблоттинга применяли метод полусухого переноса (Towbin et al., 1979). Нитроцеллюлозу окрашивали 0.5%-ным Понсо С. Инкубацию с первыми антителами, которые разводили в соотношении 1 : 50, проводили 1 ч при комнатной температуре на качалке. Первыми антителами служили аутоиммунные сыворотки М68 и К43. В качестве вторых антител использовали антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена. Для проявки фильтры инкубировали в 5 мг/мл 3,3-диаминобензидина в буфере 10 мМ Трис (pH 7.6) с добавлением перекиси водорода до появления коричневой окраски.

В работе использовали следующие реактивы: среда 199, раствор Хенкса и сыворотка крупного рогатого скота



(Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов, Россия); антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Имтек, Россия); гентамицин (Хемофарм, Югославия); PFA (Merck, Германия); PBS, Тритон X-100, Твин 20, ТЭА, PMSF, ЭДТА, DAPI, Moviол 488, ДНКаза I,

Рис. 1. Определение молекулярных масс белков, выявляемых с помощью сывороток К43 и М68.

Электрофорез в полиакриламидном геле (а) и иммуноанализ (б) белков тотального клеточного экстракта культуры СПЭВ: М — положение маркеров молекулярной массы, кДа; 1 — окраска Кумасси, 2 — окраска аутоиммунной сывороткой К43, 3 — окраска аутоиммунной сывороткой М68.

РНКаза А и кроличьи антитела к иммуноглобулинам человека, меченные ФИТЦ, набор белковых метчиков (Sigma, США); ПонсоС (Serva, Германия).

### Результаты

Характеристика аутоиммунных антител. При исследовании тотальных белков клеток культуры СПЭВ с помощью метода иммуноблоттинга показали, что антитела аутоиммунных сывороток связываются с ранее неизвестными белками: К43 конъюгируют с полипептидами с мол. массой 38 кДа, а сыворотка М68 связывается с белками, имеющими мол. массу 50 кДа (рис. 1, б, дорожки 2, 3).

Для общей характеристики предполагаемых белков ядерного матрикса необходимо описать локализацию этих белков в интерфазных ядрах и на митотических хромосомах необработанных клеток.

Окрашивание хроматина в необработанных клетках. Флуорохром DAPI в интерфазных ядрах

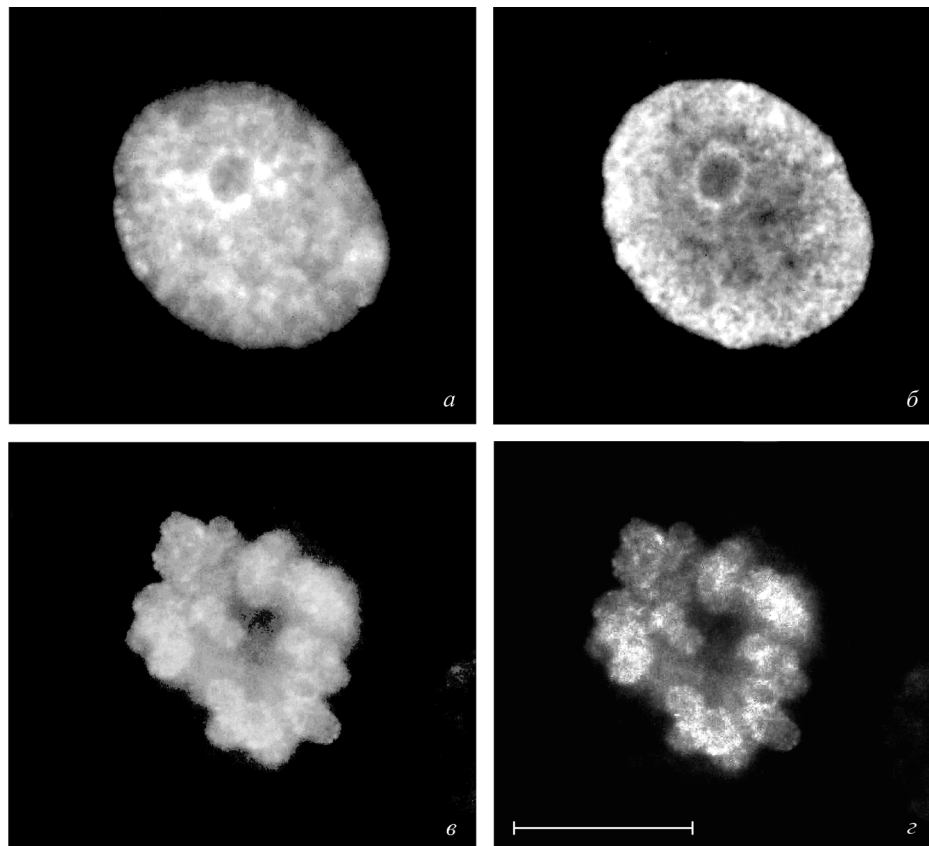


Рис. 2. Локализация антител к белку с мол. массой 50 кДа в необработанных клетках культуры СПЭВ. Контроль со вторыми антителами отрицательный.

а, б — интерфаза; в, г — прометафаза. а, в — окрашивание DAPI; б, г — иммунофлуоресцентное окрашивание антителами. Масштабный отрезок — 10 мкм.

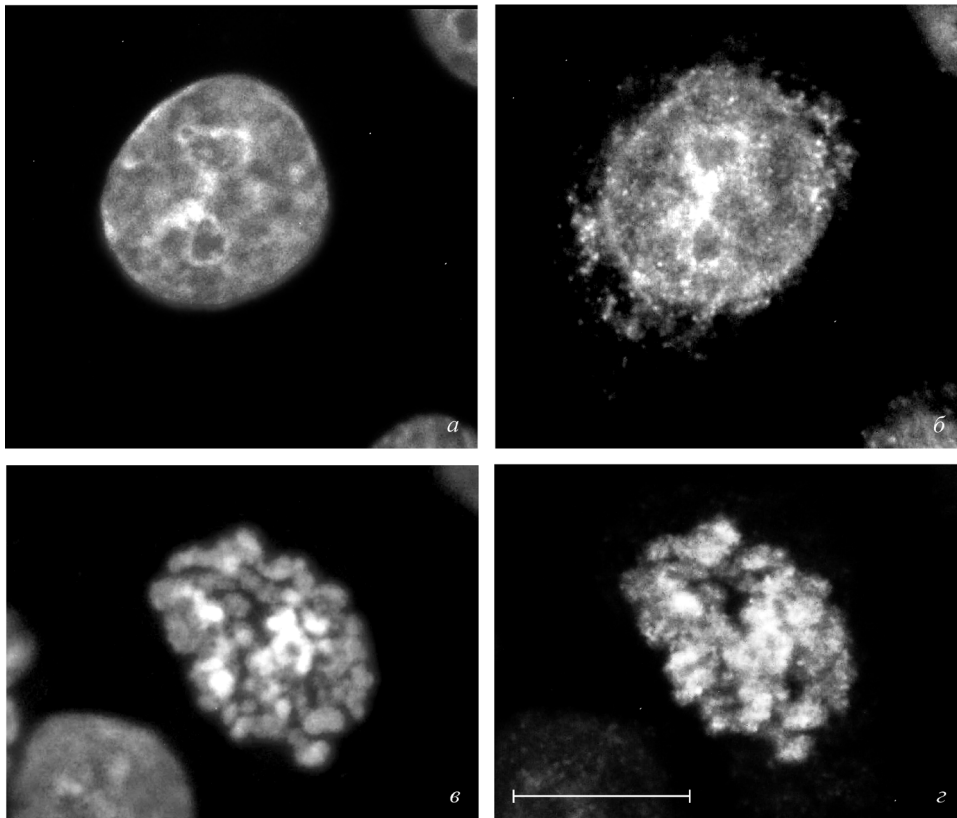


Рис. 3. Локализация антител к белку с мол. массой 38 кДа в необработанных клетках культуры СПЭВ. Контроль со вторыми антителами отрицательный.

*a, б* — интерфаза; *в, г* — прометафаза. *a, в* — окрашивание DAPI; *б, г* — иммунофлуоресцентное окрашивание антителами. Масштабный отрезок — 10 мкм.

клеток культуры диффузно окрашивал все ядро, в котором встречались небольшие сильно флуоресцирующие глыбки хроматина. Периферия ядрышек окрашивалась интенсивно в виде тонкого ободка, в то время как сами ядрышки оставались темными (рис. 2, *a*; 3, *a*). Околяядрышковый хроматин имел интенсивное окрашивание. Хромосомы окрашивались по всей длине (рис. 2, *в*; 3, *в*).

Локализация белка с мол. массой 50 кДа. В интерфазных клетках антитела к белку выявлены в ядре в виде небольших скоплений. Интенсивную флуоресценцию наблюдали в зоне околяядрышкового хроматина, в

то время как сами ядрышки, а также цитоплазма оставались неокрашенными (рис. 2, *б*). В прометафазных клетках флуоресцирующий материал образует по периферии каждой хромосомы чехол или муфту, не окрашивая при этом сами хромосомы (рис. 2, *г*).

Локализация белка с мол. массой 38 кДа. В интерфазных клетках интенсивную флуоресценцию наблюдали в зоне околяядрышкового хроматина, в то время как сами ядрышки оставались неокрашенными. На фоне диффузно окрашенного ядра выявляли большое количество ярких мелких гранул, а также небольшое количество гранул обнаруживали в цитоплазме (рис. 3, *б*). В митоти-

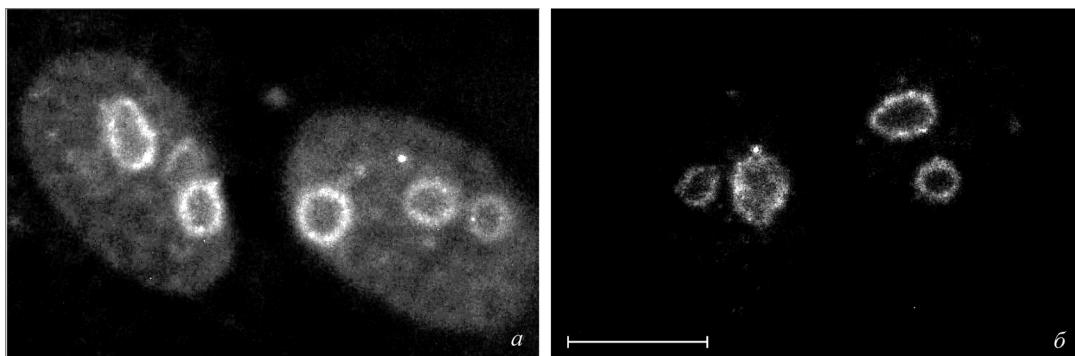


Рис. 4. Локализация антител к белку с мол. массами 50 (*a*) и 38 (*б*) кДа в составе ядерного белкового матрикса. Контроль со вторыми антителами отрицательный.

*a, б* — иммунофлуоресцентное окрашивание антителами. Масштабный отрезок — 10 мкм.

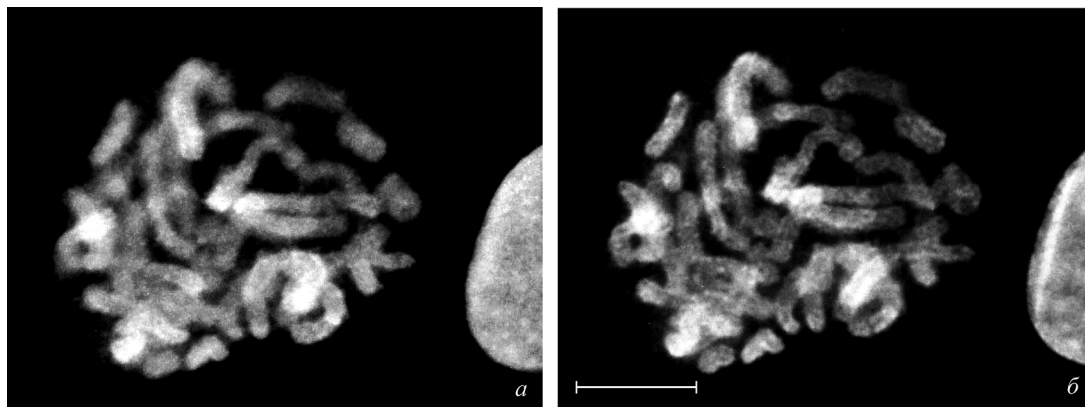


Рис. 5. Локализация антител к белку с мол. массой 50 кДа в условиях искусственной деконденсации хроматина. Контроль со вторыми антителами отрицательный.

*а, б* — прометафазные клетки в условиях гипотонии; *а* — окрашивание DAPI, *б* — иммунофлуоресцентное окрашивание антителами. Масштабный отрезок — 10 мкм.

ческих клетках наблюдали неравномерное свечение по длине хромосом в виде отдельных флуоресцирующих фрагментов и мелких гранул, в цитоплазме свечение не выявлялось (рис. 3, *з*). Необходимо выяснить, действительно ли исследуемые белки являются компонентами ядерного белкового матрикса и в составе каких его структур (внутриядерная белковая сеть, остаточные ядрышки, ламина) они представлены.

Ядерный белковый матрикс. После обработки клеток 2 М NaCl, ДНКазой I и РНКазой А полностью исчезало свечение флуорохрома DAPI в интерфазных ядрах и хромосомах митотических клеток, что говорит о полном удалении ДНК.

Локализация белка с мол. массой 50 кДа в ЯБМ. В интерфазных клетках антитела к белку неоднородно окрашивают ядро и периферию остаточных ядрышек (рис. 4, *а*).

Локализация белка с молекулярной массой 38 кДа в ЯБМ. Антитела к белку с мол. массой 38 кДа окрашивали только периферию остаточных ядрышек интерфазных клеток, в ядре флуоресценция отсутствовала (рис. 4, *б*).

Из результатов следует, что в необработанных клетках исследуемые белки ЯБМ в митозе входят в состав периферического хромосомного материала. Вместе с тем остается пока неясным, насколько устойчива связь этих белков с хромосомами.

Мы предполагаем, что действие гипотонии, приводящей к значительному изменению объема хромосом, может сказаться на степени связи белков ПХМ с митотическими хромосомами. На основании этого была сделана попытка изучить степень ассоциации исследуемых ядерных белков с поверхностью хромосом при их экспериментальной деконденсации.

Искусственная деконденсация хроматина. После воздействия на клетки гипотоническим раствором интерфазные ядра окрашивались DAPI диффузно, а в составе прометафазных или К-метафазных пластинок выявлялись набухшие хромосомы (рис. 5, *а*; 6, *а, в*).

Локализация белка с мол. массой 50 кДа. После искусственной деконденсации хроматина ядра интерфазных клеток окрашиваются антителами к белку с мол. массой 50 кДа диффузно, а в митотических клетках флуоресценция наблюдается на периферии набухших хромосом в виде муфты (рис. 5, *б*).

Локализация белка с молекулярной массой 38 кДа. После воздействия на клетки гипотоническим раствором и обработки антителами к полипептиду с мол. массой 38 кДа на фоне диффузного окрашивания ядра содержали мелкие флуоресцирующие гранулы. В митотических клетках обнаружили неравномерное свечение по длине хромосом в виде отдельных флуоресцирующих фрагментов и мелких гранул, в цитоплазме свечение не выявили (рис. 6, *б, з*). При этом особенно хорошо флуоресценция хромосом наблюдалась в клетках с разрушенной цитоплазматической мембраной (рис. 6, *з*). Можно отметить, что связь исследуемых белков ЯБМ с поверхностью хромосом не нарушается.

В связи с тем что при окрашивании ЯБМ изучаемыми аутоиммунными антителами мы не увидели в ядре ярко флуоресцирующих гранул, было решено обработать клетки РНКазой.

Искусственная деконденсация хроматина с последующей обработкой клеток РНКазой. В случае искусственной деконденсации хроматина и последующей обработки препаратов РНКазой антитела к обоим белкам окрашивали ядра интерфазных клеток диффузно. При обработке митотических клеток антителами к белкам с мол. массами 50 и 38 кДа на периферии набухших хромосом наблюдали флуоресцирующий материал в виде чехла или муфты, а цитоплазма клеток не окрашивалась (рис. 7, *б, з*).

Искусственная деконденсация хроматина с последующей реконденсацией хромосом. Чтобы ответить на вопрос о том, насколько стабильна связь исследуемых белков ЯБМ с поверхностью хромосом, клетки подвергали действию гипотонии, а затем возвращали в изотоническую среду, поскольку оба эти воздействия приводят к значительному изменению объема хромосом.

После возвращения клеток из гипотонической в нормальную среду культивирования окраска ядер флуорохромом DAPI повторяла таковую в контроле: периферия ядер не окрашена, в ядре наблюдаются глыбки хроматина разного размера, ядрышки окружены тонким флуоресцирующим ободком (рис. 8, *а*; 9, *а*).

Локализация белка с мол. массой 50 кДа. После реконденсации хроматина и окрашивания клеток антителами к белку с мол. массой 50 кДа в ядре наблюдались гранулы светящегося материала, которые идентичны

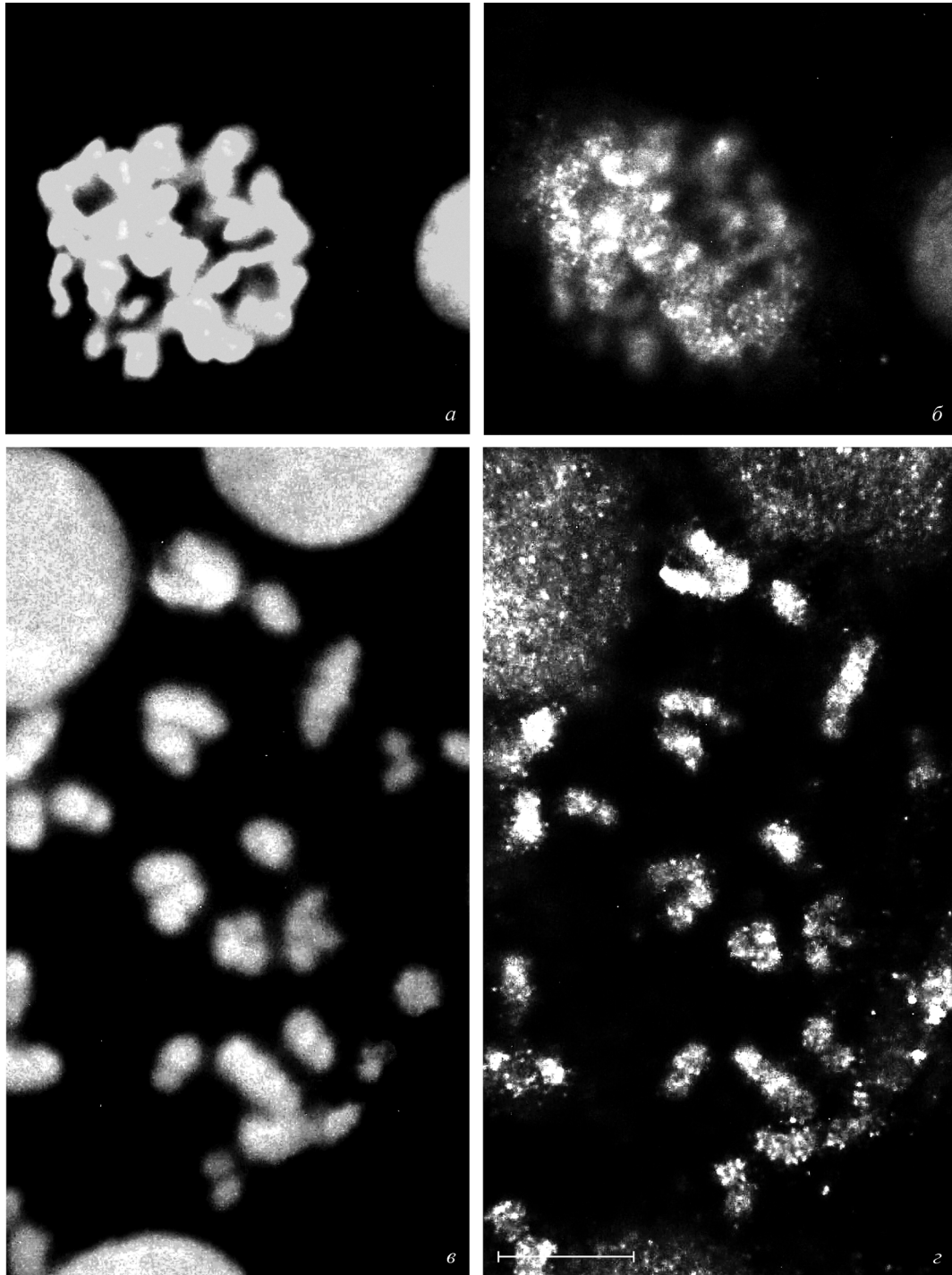


Рис. 6. Локализация антител к белку с мол. массой 38 кДа в условиях искусственной деконденсации хроматина. Контроль со вторыми антителами отрицательный.

*a—z* — прометафазные клетки в условиях гипотонии; *a, в* — окрашивание DAPI; *б, z* — иммунофлуоресцентное окрашивание антителами. Масштабный отрезок — 10 мкм.

по локализации хроматину. Интенсивную флуоресценцию выявили в зоне околядрышкового хроматина, в то время как сами ядрышки, а также цитоплазма оставались неокрашенными. В митотических клетках весь флуоресцирующий материал образует чехол или муфту вокруг групп хромосом, а сами хромосомы при этом не окрашиваются (рис. 8, *б, z*).

Локализация белка с мол. массой 38 кДа. В условиях реконденсации хромосом и окрашивании

клеток антителами к белку 38 кДа в интерфазных ядрах наблюдали гранулы светящегося материала, а ядрышки окружены тонким флуоресцирующим ободком. В митотических клетках обнаружено свечение хромосом и мелких светящихся гранул по периферии групп хромосом. В цитоплазме как в интерфазе, так и в митозе видны гранулы флуоресцирующего материала (рис. 9, *б, z*).

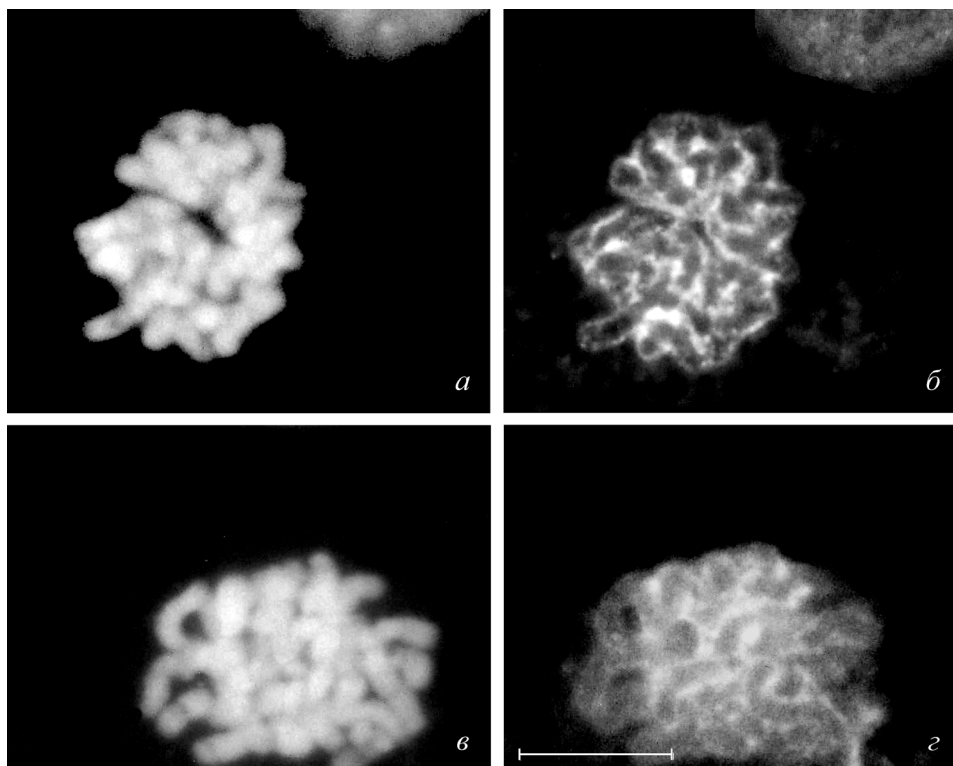


Рис. 7. Локализация антител к белку с мол. массами 50 (а, б) и 38 (в, з) кДа в условиях искусственной деконденсации хроматина с последующей обработкой клеток РНКазой. Контроль со вторыми антителами отрицательный.

а—з — прометафазные клетки; а, в — окрашивание DAPI; б, з — иммунофлуоресцентное окрашивание антителами. Масштабный отрезок — 10 мкм.

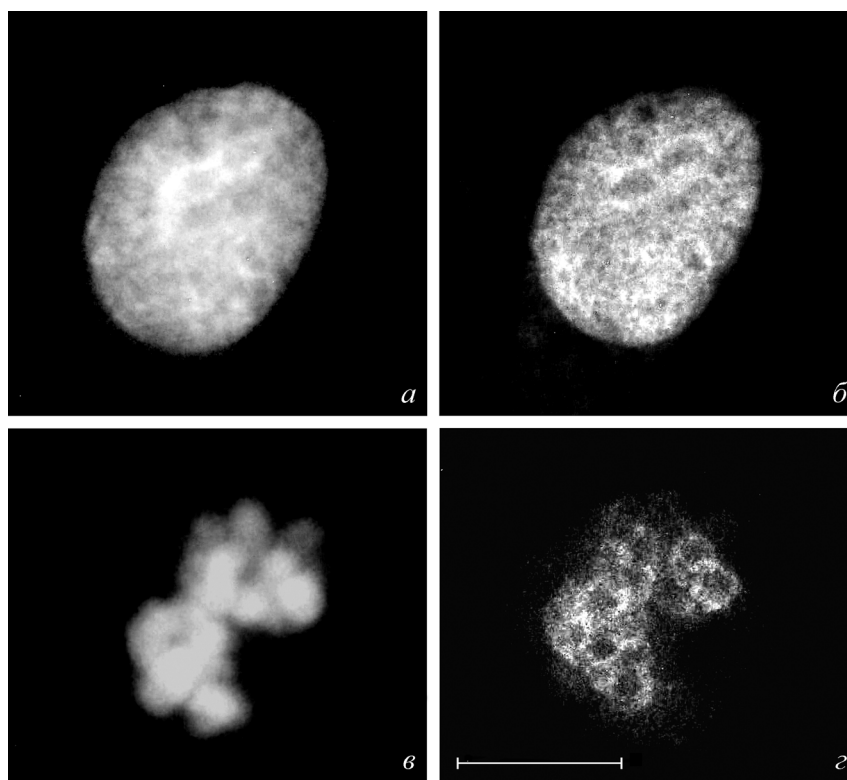


Рис. 8. Локализация антител к белку с мол. массой 50 кДа в условиях искусственной деконденсации и последующей реконденсации хроматина. Контроль со вторыми антителами отрицательный.

а, в — окрашивание DAPI; б, з — иммунофлуоресцентное окрашивание антителами. Масштабный отрезок — 10 мкм.

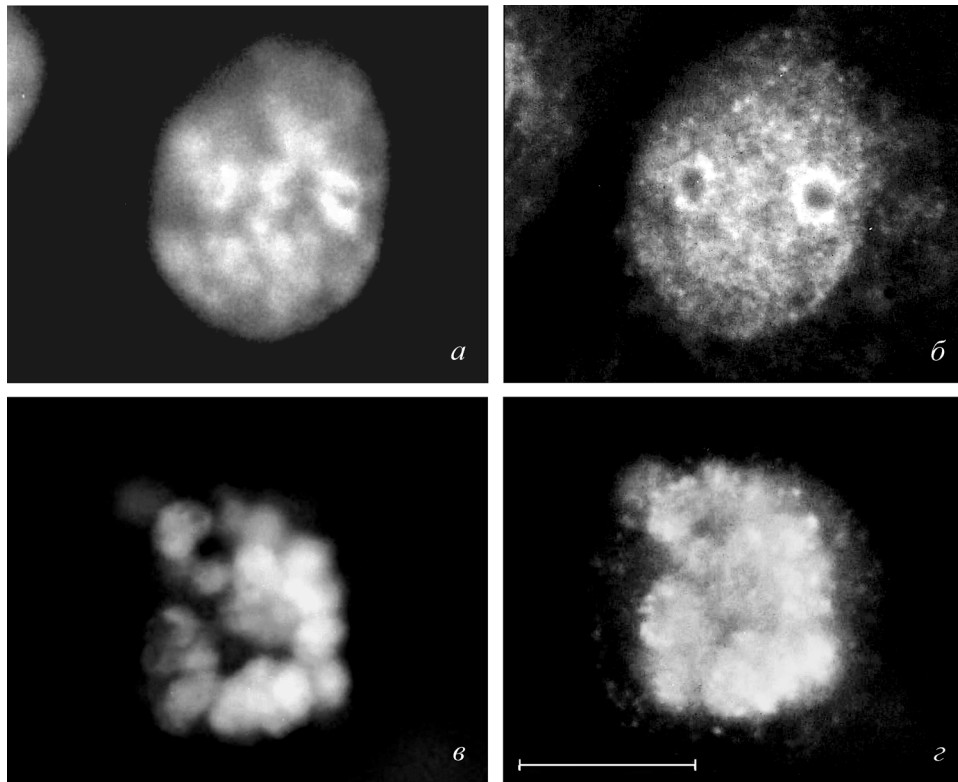


Рис. 9. Локализация антител к белку с мол. массой 38 кДа в условиях искусственной деконденсации и последующей реконденсации хроматина. Контроль со вторыми антителами отрицательный.

*a, в* — окрашивание DAPI; *б, г* — иммунофлуоресцентное окрашивание антителами. Масштабный отрезок — 10 мкм.

### Обсуждение

Как уже упоминалось, в митозе ПХМ хромосом состоит из белков ядрышка и неядрышковых белков ядерного происхождения (Higashiura et al., 1992; Hernandez-Verdun, Gautier, 1994; Van Hooser et al., 2005). Исследования неядрышковых белков ЯБМ проводят с помощью моноклональных антител или антител аутоиммунных сывороток. Было обнаружено, что эти неядрышковые и нехроматиновые белки имеют главным образом диффузное распределение в интерфазных ядрах (Zbarsky, Georgiev, 1959; Chaly et al., 1984; Cai, Zhai, 1994). Мол. масса этих белков может варьировать от 25 до 280 кДа (Berezney, Coffee, 1977; Ченцов и др., 1999; Косых, Ченцов, 2002; Van Hooser et al., 2005), что говорит об их большом разнообразии. Исследованные нами аутоиммунные сыворотки М68 и К43 содержали антитела к белкам с мол. массами 50 и 38 кДа и имели локализацию в интерфазном ядре или в ядерном матриксе, отличную от белков ПХМ, ранее описанную нами или другими авторами. В необработанных клетках оба белка локализованы в районе околядрышкового хроматина и выявлялись в ядре: первый в виде небольших скоплений, а второй в виде ярких мелких гранул на фоне диффузно окрашенного ядра. Ранее нами уже был обнаружен неядрышковый белок в составе ПХМ, образующий ободок вокруг ядрышек, локализующийся в ядре диффузно и имеющий иную молекулярную массу (Ченцов и др., 1999).

Вместе с тем остаются пока неясными природа, функциональное значение и стабильность связи компонентов ПХМ с хромосомами. Ранее было показано, что ПХМ

оказывается устойчивым к обработке изолированных хромосом гипотоническими растворами в условиях, разрушающих интерфазные ядрышки (Gautier et al., 1992).

Кроме того, при действии гипотонии на живые клетки культуры ткани происходит обратимая деконденсация митотических хромосом, при которой связь различных компонентов ПХМ с хромосомой может быть стабильной или лабильной, а устойчивость связи различных компонентов ПХМ с хромосомами тоже может быть различной (Мухарьямова, Зацепина, 1993; Мухарьямова и др., 1998; Косых, Ченцов, 2002). В связи с этим нами была сделана попытка изучить степень ассоциации исследуемых ядерных белков с поверхностью хромосом как при их экспериментальной деконденсации, так и при последующем возвращении клеток в изотонические условия. Мы предполагали, что действие гипотонии, приводящей к значительному изменению объема хромосом при их набухании, может сказаться на степени связи белков ПХМ с митотическими хромосомами.

В настоящей работе показано, что при окраске митотических клеток антителами к белку с мол. массой 50 кДа при экспериментальной деконденсации хромосом и деконденсации с последующей реконденсацией в изотонической среде флуоресценцию выявили на периферии набухших хромосом в виде муфты. Такую же картину наблюдали при деконденсации хромосом с последующей обработкой препаратов РНКазой. Исходя из этих наблюдений можно полагать, что белок с мол. массой 50 кДа сохраняет прочную связь с периферией хромосом, поскольку она не нарушается при значительных изменениях объема тела митотических хромосом и обработке РНКазой.



При окраске митотических клеток антителами к белку с мол. массой 38 кДа после экспериментальной деконденсации хроматина флуоресценцию обнаружили по длине хромосом в виде отдельных светящихся фрагментов и мелких светящихся гранул, что соответствовало окраске в норме. В то же время в опыте с деконденсацией и последующей реконденсацией в изотонической среде флуоресценцию наблюдали на периферии хромосом, а также в виде гранул светящегося материала в цитоплазме. Вместе с тем в условиях деконденсации хромосом с последующей обработкой препаратов РНКазой этот белок обнаружили на периферии набухших хромосом в виде муфты, а гранул светящегося материала вокруг хромосом и в цитоплазме выявлено не было.

На основании полученных данных можно заключить, что белок с мол. массой 38 кДа может быть ассоциирован не только с ДНК, но и с РНК. Известно, что белки разной интерфазной локализации (некоторые ядрышковые белки и белки ядерного матрикса) могут иметь различную степень ассоциации с периферией хромосом как во время гипотонической деконденсации, так и при последующей реконденсации в изотонической среде (Мухарьямова и др., 1998; Ченцов и др., 1999; Косых, Ченцов, 2002). Так, например, ядрышковый белок фибрилларин прочно связан с хромосомой во время деконденсации хроматина, а белок В-23 теряет эту связь с поверхностью хромосом при гипотоническом воздействии, но по мере реконденсации хромосом В-23 обнаруживается в цитоплазме и на периферии групп митотических хромосом (Yasuda, Maul, 1990; Мухарьямова, Зацепина, 1993; Косых, Ченцов, 2002). Существуют также данные о том, что связь других ядрышковых белков, например перихромонуклеолина (Shi et al., 1987), Ku-P (Higashiura et al., 1992), а также белков, имеющих мол. массы 103 и 52 кДа (Gautier et al., 1992), с хромосомой не нарушается после обработки клеток гипотонической средой. Подобным же образом не изменяют своей локализации после действия гипотоники на клетки некоторые неядрышковые белки, такие как перихромин (McKeon et al., 1984), белки с мол. массами 125 (Davis et al., 1987), 45 (Belyaev et al., 1992), 58 (Vega-Salas, Salas, 1996) и 65 (Ченцов и др., 1999) кДа. Все это может говорить о том, что часть белков ПХМ, так же как и белок с мол. массой 50 кДа, не просто имеет сродство к поверхности хромосом, но структурно с ней связана.

В пользу этого говорят также данные о неизменной локализации белков ядерного матрикса в составе ПХМ после солевой и нуклеазной экстракции гистонов и ДНК митотических хромосом (Ченцов и др., 1999; Косых, Ченцов, 2002).

Оказалось, что после экстракции хроматина и РНК антитела к белкам с мол. массами 38 и 50 кДа, так же как и к другим белкам ядерного матрикса (Ченцов и др., 1999; Ченцов, 2000; Косых, Ченцов, 2002), окрашивают сходным образом периферию интерфазных ядрышек. Однако только белок с мол. массой 38 кДа из всех компонентов ядерного матрикса (ламина, внутренней белковой сети, остаточного ядрышка) содержится исключительно на периферии остаточных ядрышек. Вместе с тем белок с мол. массой 50 кДа, как и другие белки ядерного матрикса, в том числе и описанный нами ранее белок NMP65, образует компоненты внутренней белковой сети (Chaly et al., 1984; Gautier et al., 1992; Ченцов и др., 1999). Все эти данные говорят о локализации некоторых ядрышковых и неядрышковых белков в ядрышковом матриксе (остаточных ядрышках) — компоненте ядерного матрикса — и об их менее стабильной, чем

у белка NMP65 и полипептида с мол. массой 50 кДа, связи с компонентами ядерного матрикса.

Авторы выражают благодарность О. В. Зацепиной за предоставленные аутоиммунные сыворотки, а также А. А. Минину за помощь, оказанную при постановке иммуноблотинга.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-01779-а).

### Список литературы

- Бураков В. В., Чабан И. А., Поляков В. Ю., Ченцов Ю. С. 1994. Экстрахромосомный периферический материал в эндосперме пшеницы. Цитология. 36 (11) : 1062—1068.
- Киреев И. И., Зацепина О. В., Поляков В. Ю., Ченцов Ю. С. 1988. Ультраструктура митотических хромосом клеток СПЭВ при их обратной искусственной деконденсации *in vivo*. Цитология. 30 (8) : 926—932.
- Косых М. И., Ченцов Ю. С. 2002. Стабильность связи периферического материала с митотическими хромосомами. Цитология. 44 (6) : 592—598.
- Мухарьямова К. Ш., Дудник О. А., Сперанский А. И., Зацепина О. В. 1998. Сравнительная локализация основных белков ядрышка фибрилларина и В—23 в делящихся клетках млекопитающих. Биол. мембраны. 15 (6) : 657—666.
- Мухарьямова К. Ш., Зацепина О. В. 1993. Структурные и иммуноцитохимические особенности ядрышек, формирующихся в условиях пространственного разобщения ядрышкообразующих хромосом. Цитология. 35(5) : 3—8.
- Ченцов Ю. С. 2000. Периферический материал, или матрикс, митотических хромосом: строение и свойства. Онтогенез. 31 (6) : 457—469.
- Ченцов Ю. С., Бураков В. В., Косых М. И. 1999. Перенос белков ядерного матрикса в составе периферического материала митотических хромосом. Биол. мембраны. 16 (6) : 647—656.
- Ченцов Ю. С., Поляков В. Ю. 1974. Ультраструктура клеточного ядра. М.: Наука. 206 с.
- Belyaev N. D., Budker V. G., Dubrovskaya V. A., Kim A. A., Kiseleva E. V., Sidorov V. N. 1992. Localization of protein forming the outer surface of isolated metaphase chromosomes. FEBS Lett. 207 : 43—45.
- Berezney R., Coffey D. S. 1977. Nuclear matrix: isolation and characterization of a structure from rat liver nuclei. J. Cell Biol. 73 : 616—637.
- Berezney R., Mortillaro M. J., Ma H., Wei X., Samarabandu J. 1995. The nuclear matrix: a structural for genomic function. Intern. Rev. Cytol. 162 : 1—65.
- Cai S. T., Zhai Z. H. 1994. Behaviour of 280 kD nuclear matrix protein in mitotic HeLa cells. Chinese science bulletin. 39 : 1656—1658.
- Chaly N., Bladon T., Setterfield G., Little J. E., Kaplan J. G., Braun D. L. 1984. Changes in distribution of the nuclear matrix antigens during the mitotic cell cycle. J. Cell Biol. 99 : 661—671.
- Davis F. M., Werner R.-D., Rao P. N. 1987. Monoclonal antibody with specificity to mitotic chromosomes of primates. Exp. Cell Res. 170 : 417—427.
- Dundr M., Meier U. T., Lewis N., Rekoeh D., Hammarstrand M. L., Olson M. O. 1997. A class of nonribosomal nuclear components is located in chromosomal periphery and in nucleolus-derived foci during anaphase and telophase. Chromosoma. 105 : 407—417.
- Gautier T., Fomproix N., Masson C., Azum-Gelade M.-C., Gas N., Hernandez-Verdan D. 1994. Fate of specific nucleolar perichromosomal proteins during mitosis: cellular distribution and association with U3 snoRNA. Biol. Cell. 82 : 81—93.
- Gautier T., Masson C., Quantana C., Arnoult J., Hernandez-Verdan D. 1992. Relocalization of nucleolar proteins around

chromosomes at mitosis: a study by confocal laser scanning microscopy. *Chromosoma*. 101 : 502—510.

Georgiev G. P., Chentsov Y. S. 1962. The structural organization of nucleolochromosomal ribonucleoproteins. *Exp. Cell Res.* 27 : 570—572.

Hernandes-Verdun D., Gautier T. 1994. The chromosome periphery during mitosis. *Bioessays*. 16 : 179—185.

Higashiura M., Shimizu Y., Tanimoto M., Morito T., Yagura T. 1992. Immunolocalization of Ku-protein (p80/p70): localization of p70 to nucleoli and periphery of both interphase nuclei and metaphase chromosomes. *Exp. Cell Res.* 201 : 444—451.

Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*. 227 : 680—685.

Lafontaine J. G. 1968. Structural component of the nucleus in mitotic plant cells. *The nucleus*. New York: Acad. Press. 152—196.

McClintock B. 1934. The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in the *Zea mays*. *Z. f. Zellforsch.* 21 : 294—328.

McKeon F. D., Tuffanelli D. L., Kobayashi S., Kirschner M. W. 1984. The redistribution of a conserved nuclear envelope protein during the cell cycle suggests a pathway for chromosome condensation. *Cell*. 36 : 83—92.

Medina F. J., Cerdido A., Fernandez-Gomez M. E. 1995. Components of the nucleolar processing complex (Pre-rRNA, fibrillarin, and nucleolin) colocalize during mitosis and are incorporated to daughter cell nucleoli. *Exp. Cell Res.* 221 : 111—125.

Nebel B. R. 1932. Chromosome structure in *Tradescantia*. I. Method and morphology. *Z. f. Zellforsch.* 16 : 251—284.

Olson M. O., Dundr M. 2005. The moving parts of the nucleolus. *Histochem. Cell Biol.* 123 : 203—216.

Sharp L. W. 1929. Structure of large somatic chromosomes. *Bot. Gaz.* 88 : 349—354.

Shi L., Zumei N., Shi Z., Ge W., Yang Y. 1987. Involvement of a nucleolar component, perichromonucleolin, in the condensation and decondensation of chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 84 : 7953—7956.

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedures and some application. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 76 : 4350—4354.

Van Hooser A. A., Yuh P., Heald R. 2005. The perichromosomal layer. *Chromosoma*. 114 : 377—388.

Vega-Salas D. E., Salas, P. J. Y. 1996. Cell cycle related behavior of chromosomal scaffold proteins in MDCK epithelial cell. *Chromosoma*. 104 : 321—331.

Yasuda Y., Maul G. G. 1990. A nucleolar auto-antigen is part of a major chromosomal surfact component. *Chromosoma*. 99 : 152—160.

Zbarsky Y.B., Georgiev G.P. 1959. Cytological characteristic of protein and nucleoprotein of cell nuclei. *Biochim. biophys. acta*. 32 : 301—302.

Поступила 24 II 2010

#### THE NUCLEAR MATRIX PROTEINS (MOL. MASS 38 AND 50 kDa) ARE TRANSPORTED BY CHROMOSOMES IN MITOSIS

M. I. Murasheva, Yu. S. Chentsov

M. V. Lomonosov Moscow State University, Biology department;  
e-mail: marinak-m@mail.ru, yuchentsov@mail.ru

It was shown by immunofluorescence method that serum M68 and serum K43 from patients with autoimmune disease stain interphase nuclei and periphery of mitotic chromosomes of pig kidney cells. Western blotting reveals the polypeptide with mol. mass of 50 kDa in serum M68, and the polypeptide with mol. mass of 38 kDa in serum K43. In the nuclear protein matrix, the antibodies to protein with mol. mass of 38 kDa stained only nucleolar periphery, while the antibodies to the protein with mol. mass of 50 kDa stained both the nucleolar periphery and all the interphase nucleus. It shows that among all components of nuclear protein matrix (lamina, internuclear network, residual nucleoli) only nucleolar periphery contains the 38 kDa protein, while the 50 kDa protein is a part of residual nucleolar periphery and takes part in nuclear protein network formation. In the interphase cells, both proteins were *in situ* localized in the nuclei, but one of them with mol. mass of 50 kDa was in the form of small clearly outlined granules, while the other (38 kDa) was in the form of small bright granules against the background of diffusely stained nuclei. Both proteins were also revealed as continuous ring around nucleolar periphery. During all mitotic stages, the 50 kDa protein was seen on the chromosomal periphery as a cover, and the 38 kDa protein formed separate fragments and granules around them. After nuclear and chromosome decondensation induced by hypotonic treatment, both antibodies stain interphase nuclei in diffuse manner, but in mitotic cells they stained the surface of the swollen chromosomes. The polypeptide with mol. mass of 50 kDa maintained strong connection with chromosome periphery both in norm and under condition of decondensation induced by hypotonic treatment and at subsequent recondensation in isotonic medium. In contrast, the protein with mol. mass of 38 kDa partially lost the contact with a chromosome during recondensation appearing also in the form of granules in cytoplasm. The data allow to consider, that nuclear matrix proteins can be transported as a part of peripheral chromosomal material, and that they can have connection of different stability with chromosomal periphery as well as the main nucleolar proteins (fibrillarin, B-23, nucleolin et al.) and some non-nucleolar components of nuclear protein matrix.

**Key words:** chromosome, immunochemistry, mitosis, nuclear protein matrix, nucleolus, hypotonic treatment.