

## НЕГИСТОНОВЫЙ ОСТОВ МИТОТИЧЕСКИХ ХРОМОСОМ IN SITU

© М. С. Макаров, Ю. С. Ченцов

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

На примере гигантских ядер *Chironomus plumosus* мы показали (Макаров, Ченцов, 2010), что можно выявить тело политенной хромосомы после обработки ее *in situ* 2 М NaCl и ДНКазой в присутствии 2 мМ CuCl<sub>2</sub>. Ионы Cu<sup>2+</sup> стабилизируют связи между негистоновыми компонентами, которые образуют негистоновый остов, повторяющий общую морфологию и дисковый рисунок политенной хромосомы. Целью этой работы было повторить процедуру по выявлению стабилизированного негистонового остова *in situ* в обычных митотических хромосомах клеток культуры СПЭВ. После экстракции всех гистонов и ДНК в присутствии 2 мМ CuCl<sub>2</sub> удается обнаружить остаточное тело митотической хромосомы (ее негистоновый остов) на всех стадиях митоза как в проходящем свете, так и при использовании антител к белкам топоизомеразе П $\alpha$  и SMC 1. Топоизомераза П $\alpha$  и SMC 1 распределены по всему телу хромосомы равномерно и не образуют никаких осевых структур.

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

В 70-е годы XX в. впервые было показано, что выделенная митотическая хромосома сохраняет свою морфологию после обработки растворами высокой ионной силы и нуклеазами (Adolphs et al., 1977; Paulson, Laemmli, 1977). Удаление из митотической хромосомы гистонов и ДНК позволило выявить так называемый хромосомный остов (скэффолд), образованный белками негистоновой природы, от которых, как было показано в аналогичном опыте без обработки ДНКазой, отходят нити ДНК (Paulson, Laemmli, 1977). По своей структурной и функциональной природе белки скэффолда аналогичны ядерному белковому матриксу (ЯБМ) интерфазных ядер. Как известно, ЯБМ играет существенную роль в организации интерфазного ядра (Георгиев, Ченцов, 1963; Разин и др., 1980; Яровая, Разин, 1983; Hong et al., 1999) и, в частности, в организации интерфазной хромосомы особого типа — политенной хромосомы (Макаров, Ченцов, 2010).

Несмотря на большое количество работ по выявлению скэффолда в митотических хромосомах, у исследователей не сложилось единого мнения о сущности этой структуры. Часть авторов считают хромосомный скэффолд реально существующей структурой, которая принимает непосредственное участие в формировании высших уровней укладки хроматина (Lebkowski, Laemmli, 1982; Pienta, Coffey, 1984; Boy de la Tour, Laemmli, 1988; Saitoh et al., 1994). С другой стороны, есть основания считать скэффолд артефактом, так как его вид существенно зависит от способа получения препарата. Например, в присутствии двухвалентных катионов меди, кальция или магния негистоновый остов выявляется более отчетливо (Lebkowski, Laemmli, 1982; Lewis, Laemmli, 1982; Strick et al., 2001), чем без этих катионов; а в условиях гипотонии получаемый препарат скэффолда и вовсе имеет диффузный вид и не повторяет очертаний митотической хромосомы

(Goyanes et al., 1980; Okada, Comings, 1980; Paulson, 1989; Razin, 1996).

Мажорными компонентами хромосомного скэффолда являются белки семейства SMC (Saitoh et al., 1994; Strunnikov et al., 1995) и топоизомераза П $\alpha$  (Earnshaw, Heck, 1985; Gasser et al., 1986), однако их роль в организации тела хромосомы до конца неясна. Было показано, что митотическая хромосома может конденсироваться как в присутствии, так и при отсутствии белков SMC (Strunnikov et al., 1995; Hagstrom et al., 2002; Vagnarelli et al., 2006). Кроме того, у авторов нет единого мнения о распределении топоизомеразы П $\alpha$  внутри хромосомы: по одним данным, топоизомераза П $\alpha$  локализована по всему объему хромосомы (Christensen et al., 2002; Мурашова и др., 2008), по другим — только в ее центральной (осевой) части (Halligan et al., 1984; Earnshaw et al., 1985; Champoux, 2001; Maeshima, Laemmli, 2003).

Необходимо отметить, что все работы по выявлению хромосомного скэффолда проводили на изолированных хромосомах, что не может не вызывать определенных изменений в структуре тела хромосомы. Работая с гигантскими ядрами *Chironomus plumosus in situ*, мы показали, что после удаления гистонов и ДНК в присутствии 2 мМ CuCl<sub>2</sub> отчетливо выявляется негистоновый остов политенных хромосом (Макаров, Ченцов, 2010). Поэтому целью настоящего исследования было выявить негистоновый остов (скэффолд) митотической хромосомы *in situ*, т. е. без выделения хромосом из клеток, используя метод стабилизации негистоновых белков с помощью 2 мМ раствора CuCl<sub>2</sub>, а также выяснить распределение мажорных негистоновых белков в остаточном теле митотической хромосомы. Вызывает интерес также вопрос: сохраняется ли в стабилизированном негистоновом остове хромосомы та неоднородность по степени конденсации

хромосомного материала, которую можно наблюдать на выделенных митотических хромосомах, предварительно обработанных гипотоническим раствором 0.075 М КСl (Зеленин и др., 1979; Зацепина и др., 1985; Zatssepina et al., 1989)? При этом дифференциальная деконденсация хромосом, вызванная гипотонией, дает такую же картину, что и при стандартной окраске на G-бэнды, заметная как в фазовом контрасте, так и при окрашивании. Поэтому были основания предполагать, что и в хромосомном остове удастся выявить неоднородность, вызванную дифференциальной деконденсацией хромосомного материала.

### Материал и методика

**Объект.** Работа выполнена на клетках культуры СПЭВ, культивируемой в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10 % сыворотки КО52 (эмбриональная телячья сыворотка, ПанЭко, Россия) в присутствии антибиотика-антимикотика А5955 (Sigma, США) в концентрации 1 мл на 100 мл среды. 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.

**Экспериментальное воздействие.** Для увеличения проницаемости клеточных мембран использовали 0.5%-ный Тритон X-100 (Sigma, США) на фосфатном буфере Зеренсена (рН 7.2), содержащий 0.15 М NaCl. Клетки пермеабилizировали в течение 10 мин и затем добавляли стабилизирующий 2 мМ раствор CuCl<sub>2</sub> в буфере Зеренсена на 20 мин. После этого удаляли гистоны с помощью 2 М раствора NaCl в буфере Зеренсена в присутствии 2 мМ CuCl<sub>2</sub> в течение 10 мин. После 2 М NaCl клетки обрабатывали ДНКазой I (Sigma, США) в концентрации 250 мкг/мл в буфере Зеренсена при 37 °С в течение 15 мин также в присутствии 2 мМ CuCl<sub>2</sub>. Дифференциальную деконденсацию исходных хромосом вызывали с помощью гипотонического раствора 0.075М КСl в буфере Зеренсена в присутствии 2 мМ CuCl<sub>2</sub>.

**Микроскопия.** Препараты просматривали в микроскопе системы AxioVert 100 (Карл Цейс, Германия) как в фазово-контрастном режиме (объектив 100×1.4), так и при проведении иммунофлуоресцентных исследований. На общий белок клетки окрашивали по методу Пена (Pena, 1980), используя краситель бриллиантовый синий фирмы Кумасси: сначала клетки фиксировали 2.5%-ным раствором глутаральдегида в PBS в течение 20 мин, а потом окрашивали 0.1%-ным раствором красителя из расчета 2—3 капли на покровное стекло в течение 20 мин.

Для выявления топоизомеразы Па и SMC I в нормальных и стабилизированных хромосомах использовали мышиные антитела к этим белкам (Sigma, США). Перед обработкой антителами клетки фиксировали 3.7%-ным раствором параформальдегида в PBS в течение 20 мин, затем отмывали 3 раза по 5 мин в растворе PBS. Клетки обрабатывали первичными антителами к данному белку в течение 40 мин при 37 °С, 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 ФИТЦ для топоизомеразы Па и ТРИТС для SMC I (Amersham Life science, США), разведенными тем же раствором в соотношении 1 : 75, при 37 °С в течение 30 мин.

### Результаты

Выявление негистонового остова митотических хромосом. В нормальных хромосомах белковые компоненты составляют порядка 60 % хроматинового материала, поэтому митотические хромосомы культуры СПЭВ весьма интенсивно окрашиваются по методу Пена. На всех стадиях митоза (рис. 1) можно видеть характерную морфологию митотических хромосом, окрашенных бриллиантовым синим *in situ*, в таких исходных хромосомах (не обработанных 2 мМ CuCl<sub>2</sub>) должны окрашиваться как гистоновые, так и негистоновые компоненты.

Как было показано (Lebkowski, Laemmli, 1982; Lewis, Laemmli, 1982), ионы Cu<sup>2+</sup> повышают выход биохимической фракции негистоновых белков и делают рисунок ядерного белкового матрикса более выраженным, т. е. можно говорить о стабилизации негистоновых белков с помощью Cu<sup>2+</sup>. На рис. 2 видно, что добавление в культуру клеток 2 мМ CuCl<sub>2</sub> не вызывает видимых изменений в структуре хромосом; на всех стадиях митоза хромосомы, обработанные *in situ* 2 мМ CuCl<sub>2</sub> и окрашенные по методу Пена (рис. 2), не отличаются от исходных хромосом, не содержащих ионов Cu<sup>2+</sup> (рис. 1). Если же стабилизированные таким образом хромосомы подвергнуть процедуре по выявлению ЯБМ (обработать 2 М NaCl и ДНКазой в присутствии 2 мМ CuCl<sub>2</sub>), то удастся обнаружить тела хромосом даже при удалении всех гистонов и ДНК. Хромосомы, образованные только негистоновыми белками, сохраняют свои морфологические характеристики на всех стадиях митоза (рис. 3), при этом они не набухают и их диаметр соответствует диаметру исходных хромосом. Такие хромосомы окрашиваются по методу Пена менее интенсивно, чем в норме и при стабилизации без экстракций; по-видимому, это объясняется гораздо меньшим количеством материала внутри остаточного тела хромосомы.

При окрашивании обычных интерфазных клеток по методу Пена в исходных и стабилизированных ядрах интенсивно выявляются ядрышки, в то время как остальная часть ядра окрашена достаточно слабо (рис. 1, а; 2, а); после удаления гистонов и ДНК в присутствии 2 мМ CuCl<sub>2</sub> в ядрах СПЭВ видны остаточные ядрышки, периферический слой (ламина) и внутренняя фибриллярная сеть (рис. 3, а), т. е. вид таких ядер соответствует классическому рисунку ЯБМ (Berezney, 1974).

Влияние предварительной деконденсации хромосом на морфологию негистонового остова. Предварительная обработка исходных митотических хромосом гипотоническим раствором КСl (0.075 М) вызывает дифференциальную деконденсацию тела хромосомы, хорошо различимую при окраске по методу Пена (рис. 4, а). На теле хромосомы можно видеть более светлые и более темные участки, что говорит о неоднородности компактизации хромосомного материала. Подобная неоднородность упаковки хромосомного материала, вызванная действием 0.075 М NaCl, выявляется и после воздействия на хромосомы 2 мМ CuCl<sub>2</sub> (рис. 4, б).

При обработке стабилизированных митотических хромосом 0.075 М КСl с последующим удалением гистонов и ДНК окраска по методу Пена неравномерно окрашивает негистоновый хромосомный остов (рис. 4, в, г). На остаточном теле хромосомы можно видеть участки, окрашенные более интенсивно, и участки, окрашенные менее интенсивно. Таким образом, дифференциальную

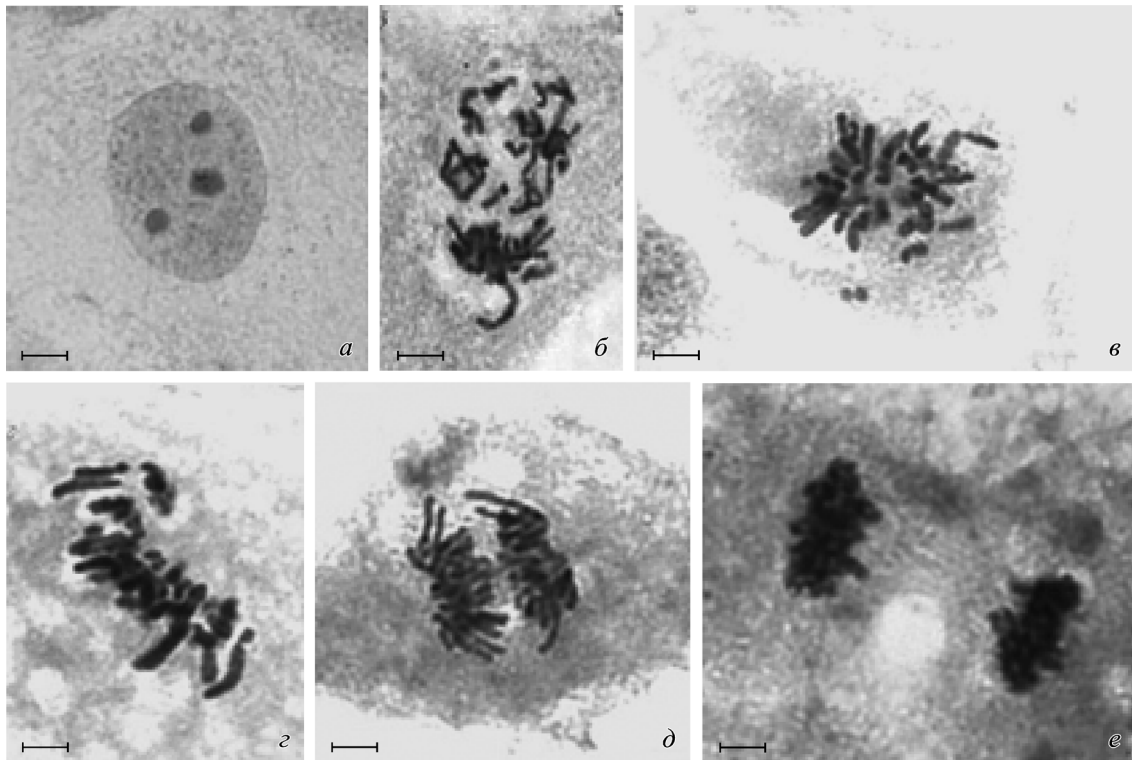


Рис. 1. Клетки культуры СПЭВ, фиксированные 2.5%-ным раствором глутаральдегида в PBS и окрашенные бриллиантовым синим по методу Пена.

*a* — интерфаза, *б* — профаза, *в, г* — прометафаза, *д* — анафаза, *е* — телофаза. Масштабные отрезки — 5 мкм.

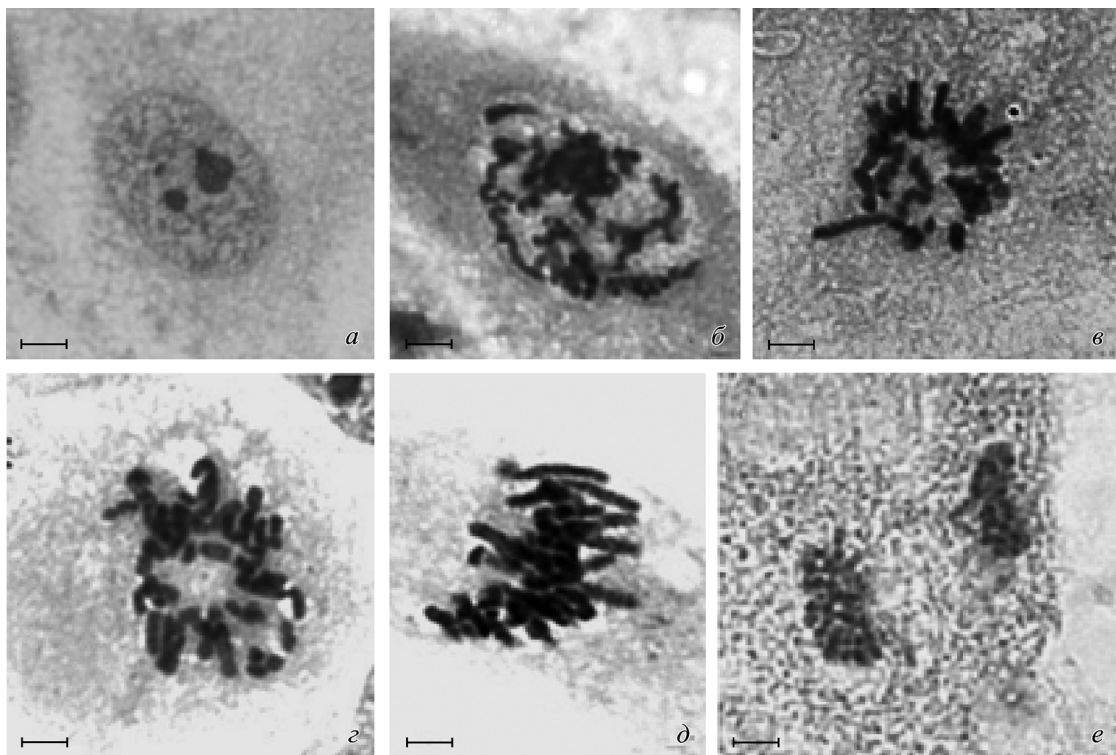


Рис. 2. Стабилизация негистоновых компонентов ионами  $\text{Cu}^{2+}$ .

*a* — интерфаза, *б* — профаза, *в, г* — прометафаза, *д* — анафаза, *е* — телофаза. Клетки культуры СПЭВ обрабатывали 2 мМ  $\text{CuCl}_2$  в присутствии детергента (1%-ный Тритон X-100), затем фиксировали 2.5%-ным глутаральдегидом и окрашивали по методу Пена. Масштабные отрезки — 5 мкм.



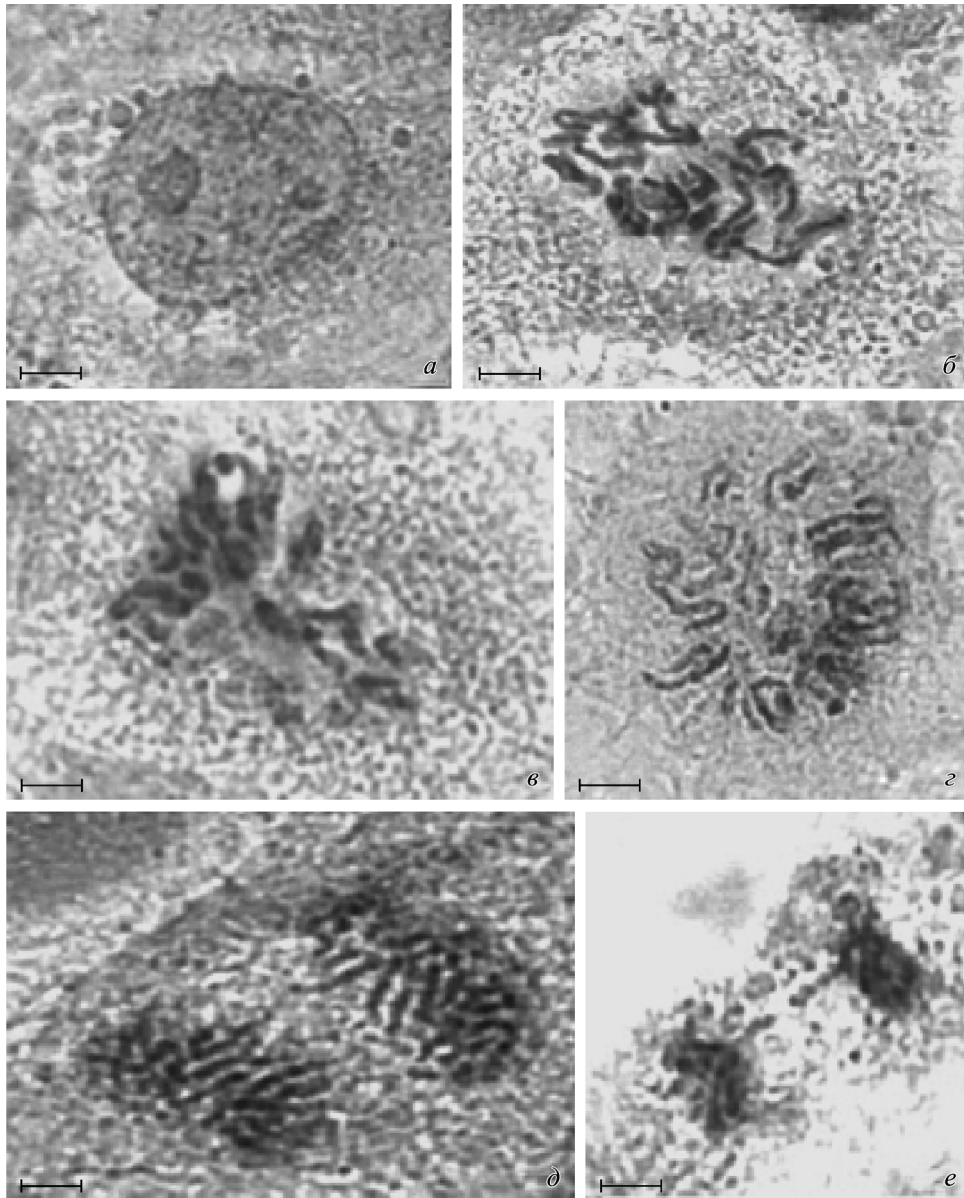


Рис. 3. Получение стабилизированного негистонового остова митотических хромосом.

*a* — интерфаза, *б* — профаза, *в*, *г* — прометафаза, *д* — анафаза, *е* — телофаза. Клетки культуры СПЭВ обрабатывали 1%-ным Тритоном X-100, 2 М NaCl и ДНКазой в присутствии 2 мМ CuCl<sub>2</sub>, фиксировали 2.5%-ным глутаральдегидом и окрашивали по методу Пена. Масштабные отрезки — 5 мкм.

деконденсацию хромосомного материала удается выявить даже при удалении всех гистонов и ДНК.

Выявление белков топоизомеразы П $\alpha$  и SMC 1 в негистоновом остове хромосом. В исходных митотических хромосомах антитела к белкам топоизомеразе П $\alpha$  и SMC 1 распределены по всему объему тела хромосомы практически равномерно (рис. 5, *а'*; 6, *а'*), повторяя ее общую морфологию. Такой характер распределения мажорных белков ЯБМ сохраняется и после стабилизации хромосом 2 мМ CuCl<sub>2</sub> (рис. 5, *б'*; 6, *б'*). Если такие стабилизированные хромосомы обработать 2 М NaCl и ДНКазой в присутствии и 2 мМ CuCl<sub>2</sub>, то в составе негистоновых остовов хромосом можно выявить и топоизомеразу П $\alpha$ , и SMC 1 (рис. 5, *в'*; 6, *в'*). Эти мажорные белки ЯБМ распределены по всему остаточному телу хромосомы, однако в одних хромосомах наблюдается гомогенное распределение антител, а в других можно видеть более и менее интенсивно священные участки в составе

негистонового остова; по всей видимости, это вызвано неоднородностью распределения остаточных негистоновых компонентов в теле хромосомы.

### Обсуждение

Используя методику стабилизации негистоновых белков с помощью 2 мМ CuCl<sub>2</sub>, нам удалось выявить тело митотических хромосом *in situ* даже после удаления всех гистонов и ДНК. Таким образом, полученная картина негистонового остова митотических хромосом аналогична той, что мы наблюдали на примере гигантских ядер *Chironomus plumosus*, когда тело политенной хромосомы в присутствии Cu<sup>2+</sup> сохранялось после всех экстракций (Макаров, Ченцов, 2010).

Тогда мы использовали термин «ядерный белковый матрикс политенной хромосомы», поскольку политенная

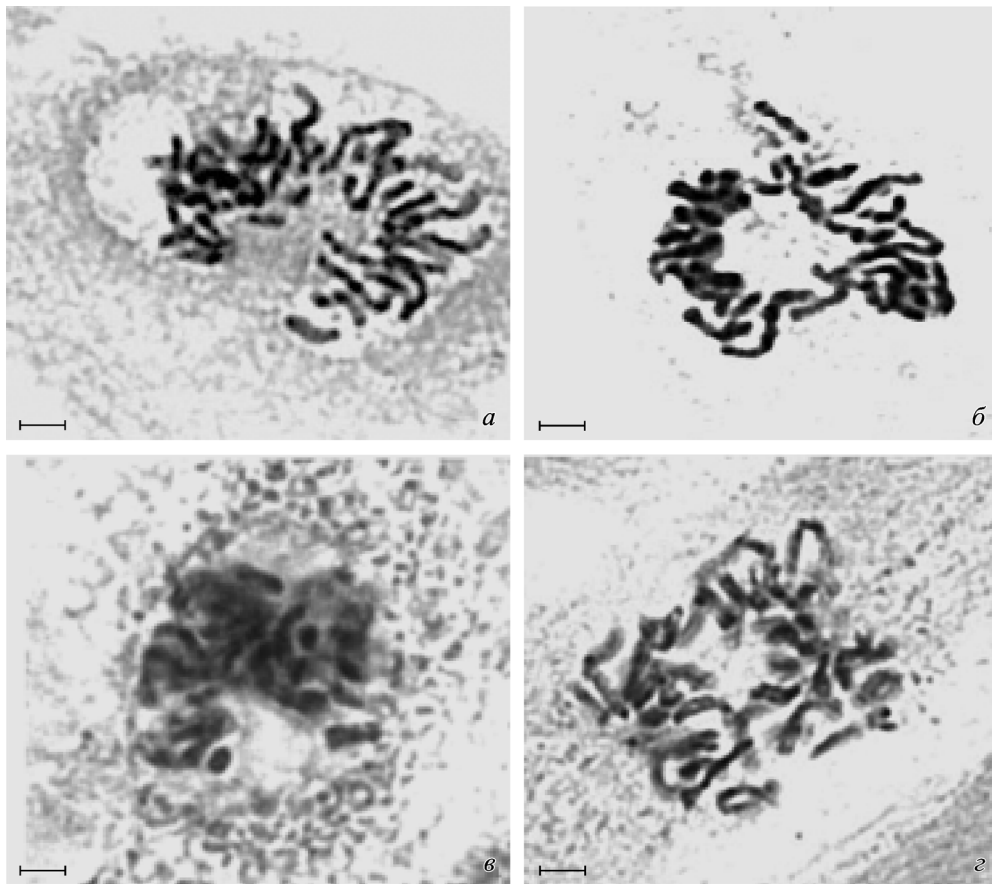


Рис. 4. Дифференциальная деконденсация хромосом в клетках культуры СПЭВ, вызванная действием 0.075 М КСI. *a* — исходные хромосомы (до обработки 2 мМ CuCl<sub>2</sub>); *б* — хромосомы, стабилизированные 2 мМ CuCl<sub>2</sub>; *в, г* — стабилизированный негистоновый остов хромосом, полученный после удаления гистонов и ДНК в присутствии 2 мМ CuCl<sub>2</sub>. Окраска по методу Пена. Масштабные отрезки — 5 мкм.

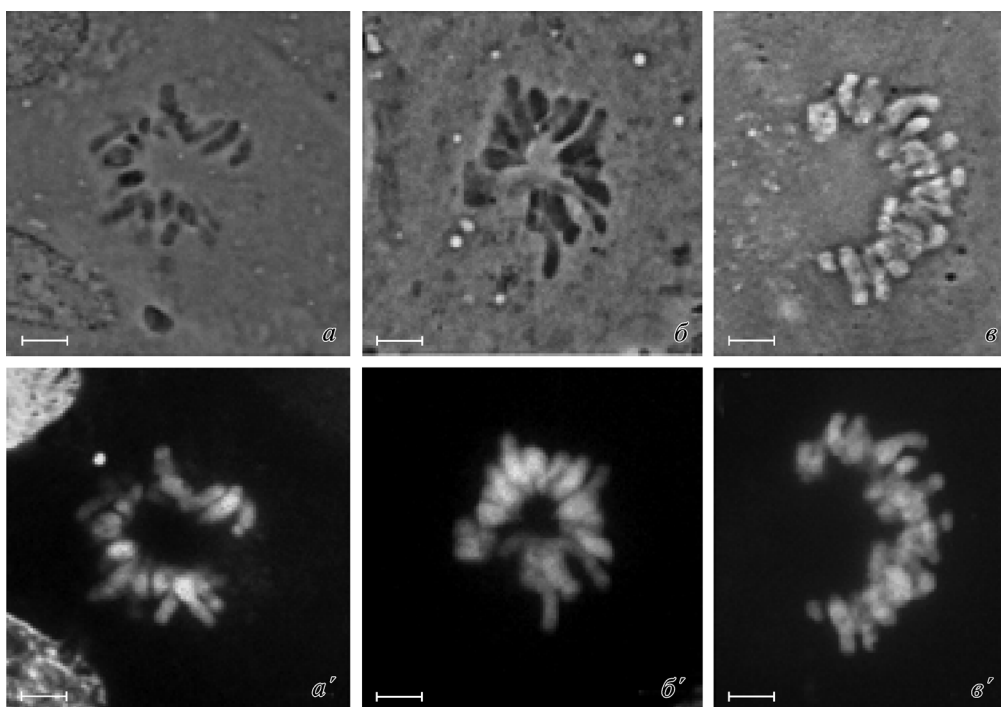


Рис. 5. Локализация топоизомеразы IIα в клетках культуры СПЭВ. *a, a'* — исходные хромосомы; *б, б'* — хромосомы, стабилизированные 3 мМ CuCl<sub>2</sub>; *в, в'* — стабилизированный негистоновый остов хромосом. Первый ряд — фазовый контраст, второй ряд — свечение антител к топоизомеразе IIα. Масштабные отрезки — 5 мкм.

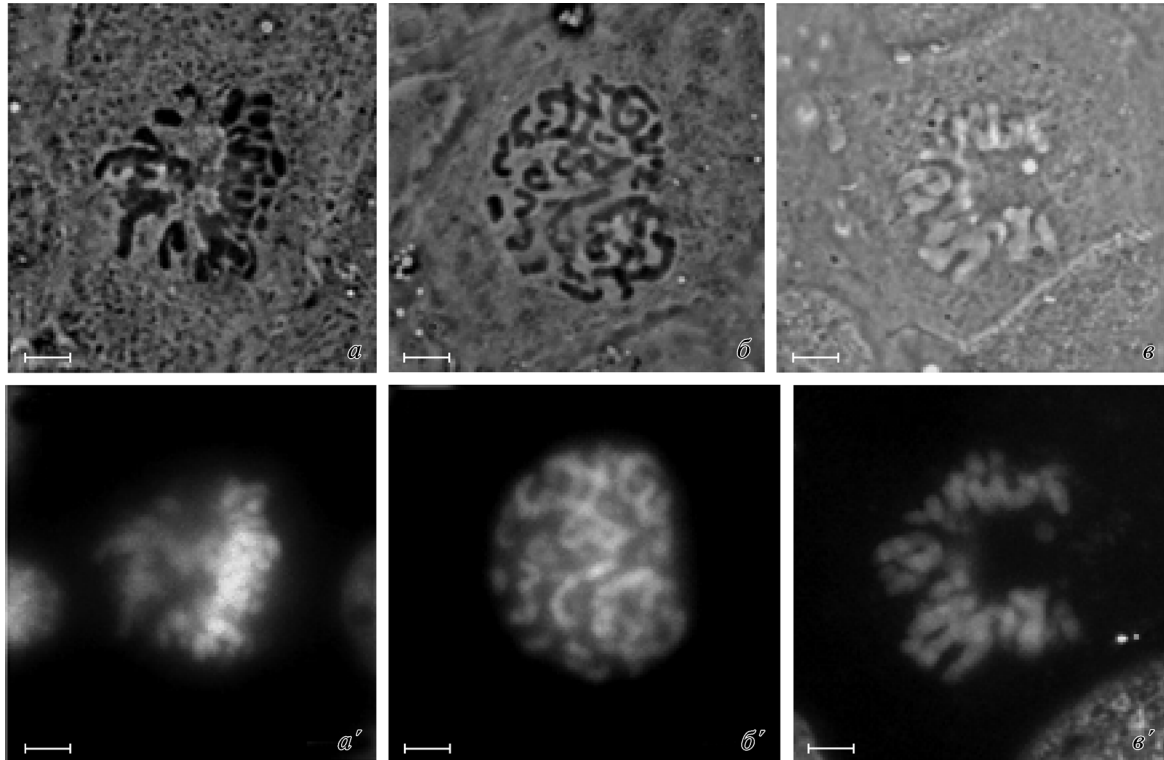


Рис. 6. Локализация SMC1 в клетках культуры СПЭВ.

*a, a'* — исходные хромосомы; *б, б'* — хромосомы, стабилизированные 2 мМ  $\text{CuCl}_2$ ; *в, в'* — стабилизированный негистоновый остов хромосом. *Первый ряд* — фазовый контраст, *второй ряд* — свечение антител к SMC1. Масштабные отрезки — 5 мкм.

хромосома является интерфазной формой хроматина. В этой работе остаточное тело хромосомы мы называем негистоновым остовом, образованным одними негистоновыми белками, которые, связываясь с ионами  $\text{Cu}^{2+}$ , способны поддержать общую морфологию митотической хромосомы. Мы не называем негистоновый остов митотической хромосомы скэффолдом, поскольку этот термин был использован для характеристики остаточного тела выделенной хромосомы, когда неэкстрагированные негистоновые компоненты образовывали некую осевую структуру, от которой отходили петли ДНК (Paulson, Laemmli, 1977; Earnshaw et al., 1985; Champroux, 2001; Maeshima, Laemmli, 2003). Но можно предположить, что такое осевое расположение негистонов является артефактным, поскольку исследования проводили на выделенных хромосомах, к тому же очень часто при исследовании таких хромосом использовалась спирт-уксусная фиксация, удаляющая часть хромосомного материала; в результате и в электронном микроскопе, и при иммуноцитохимических окрашиваниях исследователи наблюдали сильно измененную картину распределения негистоновых белков.

Существуют работы, в которых в митотических клетках *in situ* выявляли мажорные компоненты ЯБМ (например, топоизомераза  $\text{II}\alpha$ ), но они дают весьма противоречивые сведения. В одних случаях локализация топоизомеразы  $\text{II}\alpha$  имела явно осевое расположение (Maeshima, Laemmli, 2003), но в других такого не наблюдалось, и антитела распределялись по телу хромосомы равномерно (Christensen et al., 2002; Мурашова и др., 2008), причем влияние на характер локализации оказывают не только условия получения препарата, но и тип клеточной культуры. Возможно, в разных типах клеток характер распределения негистоновых белков в теле хро-

сомы может варьировать при сохранении единого плана организации.

По-видимому, морфологическая целостность митотической хромосомы зависит именно от наличия негистоновых белков; более того, можно сказать, что существует субструктуризация в негистоновой сети: как оказалось, при дифференциальной деконденсации хромосом 0.075 М КСl наблюдается неоднородность упаковки хромосомного материала как в исходных хромосомах (с полным набором гистонов и ДНК, не стабилизированных 2 мМ  $\text{CuCl}_2$ ), так и в их стабилизированном негистоновом остове, когда из митотической хромосомы удалены все гистоны и ДНК. Выходит, что распределение негистоновых белков повторяет общее распределение хроматина внутри митотических хромосом.

Исходя из вышеперечисленных наблюдений можно заключить, что остаточные негистоновые компоненты выполняют структурно важную роль, необходимую для организации такой сложной и многокомпонентной организеллы, как митотическая хромосома.

#### Список литературы

- Георгиев Г. П., Ченцов Ю. С. 1963. Об ультраструктурах ядра на основании электронной микроскопии ядер, подвергнутых солевым экстракциям. Биофизика. 8 (1): 50—56.
- Зацепина О. В., Поляков В. Ю., Ченцов Ю. С. 1985. Различия в структурной организации G- и R-сегментов, выявляемые в процессе дифференциальной деконденсации. Цитология. 28 (8): 865—871.
- Зеленин М. Г., Поляков В. Ю., Ченцов Ю. С. 1979. Индукция обратимой дифференциальной деконденсации митотических хромосом с помощью гипотонических растворов. ДАН СССР. 247 (4): 960—962.



- Макаров М. С., Ченцов Ю. С. 2010. Ядерный белковый матрикс политенных хромосом ядер слюнных желез *Chironomus plumosus*. Биол. мембраны. 27 (2) : 166—176.
- Мурашева М. И., Кульнева Е. И., Ченцов Ю. С. 2008. Локализация антител к топоизомеразе Пальфа в норме и при искусственной конденсации и деконденсации хромосом. Биол. мембраны. 25 (4) : 259—266.
- 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 : 223—233.
- Яровая О. В., Разин С. В. 1983. Два типа участков прикрепления ДНК к ядерному скелету в клетках асцитной карциномы Эрлиха. Молекуляр. биол. 17 : 303—313.
- Adolphs K. W., Cheng S. M., Paulson J. R., Laemmli U. K. 1977. Isolation of a protein scaffold from mitotic HeLa cell chromosomes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 74 : 4937—4941.
- Berezney R. 1974. Large-scale isolation of nuclear membranes from bovine liver. Methods in Cell Biol. 8 : 205—228.
- Boy de la Tour E., Laemmli U. K. 1988. The metaphase scaffold is helically folded: sister chromatids have predominantly opposite helical handedness. Cell. 55 : 937—944.
- Champoux J. J. 2001. DNA topoisomerases: structure, function and mechanism. Annu. Rev. Biochem. 70 : 369—413.
- Christensen M. O., Larsen M. K., Barthelmes H. U., Hock R., Andersen C. L., Kjeldsen E., Knudsen B R., Westergaard O., Boege F., Mielke C. 2002. Dynamics of human DNA topoisomerases IIalpha and IIbeta in living cells. J. Cell Biol. 157 : 31—44.
- 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. Ibid. 100 : 1706—1715.
- Earnshaw W. C., Heck M. M. 1985. Localization of topoisomerase II in mitotic chromosomes J. Cell Biol. 100 : 1716—1725.
- Gasser S. M., Laroche T., Falquet J., Boy de la Tour E., Laemmli U. K. 1986. Metaphase chromosome structure. Involvement of topoisomerase II. J. Mol. Biol. 188 : 613—629.
- Goyanes V. J., Matsui S., Sandberg A. A. 1980. The basis of chromatin fiber assembly within chromosomes studied by histone-DNA crosslinking followed by trypsin digestion. Chromosoma. 78 : 123—35.
- Hagstrom K. A., Holmes V. F., Cozzarelli N. R., Meyer B. J. 2002. *C. elegans* condensin promotes mitotic chromosome architecture, centromere organization, and sister chromatid segregation during mitosis and meiosis. Genes Develop. 16 : 729—742.
- 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.
- Hong M., Siegel A. J., Berezney R. 1999. Association of chromosome territories with the nuclear matrix: disruption of human chromosome territories correlates with the release of a subset of nuclear matrix proteins. Cell Biol. 3 : 531—542.
- Lebkowski J. S., Laemmli U. K. 1982. Evidence for two levels of DNA folding in histone-depleted HeLa interphase nuclei. J. Mol. Biol. 56 : 309—324.
- Lewis C. D., Laemmli U. K. 1982. Higher-order metaphase chromosome structure: evidence for metalloprotein interactions. Cell. 29 : 171—181.
- Maeshima K., Laemmli U. K. 2003. A two-step scaffolding model for mitotic chromosome assembly. Develop. Cell. 4 : 467—480.
- 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.
- Paulson J. R. 1989. Scaffold morphology in histone-depleted HeLa metaphase chromosomes. Chromosoma. 4 : 289—295.
- Paulson J. R., Laemmli U. K. 1977. The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. Cell. 12 : 817—828.
- Pena 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.
- Pienta K. J., Coffey D. S. 1984. A structural analysis of the role of the nuclear matrix and DNA loops in the organization of the nucleus and chromosome. J. Cell Sci. Suppl. 1 : 123—135.
- Razin S. V. 1996. Functional architecture of chromosomal DNA domains. Crit. Rev. Eukaryot. Gene Exp. 6 : 247—269.
- 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.
- Strunnikov A. V., Hogan E., Koshland D. 1995. SMC2, a *Saccharomyces cerevisiae* gene essential for chromosome segregation and condensation, defines a subgroup within the SMC family. Genes Develop. 9 : 587—599.
- Vagnarelli P., Hudson D. F., Ribeiro S. A., Trinkle-Mulcahy L., Spence J. M., Lai F., Farr C. J., Lamond A. I., Earnshaw W. C. 2006. Condensin and Repo-Man-PP1 co-operate in the regulation of chromosome architecture during mitosis. Nat. Cell Biol. 8 : 1133—1142.
- Zatsepina O. V., Polyakov V. Y., Chentsov Yu. S. 1989. Differential decondensation of mitotic chromosomes during hypotonic treatment of living cells as a possible cause of G-banding: an ultrastructural study. Chromosoma. 98 : 109—116.

Поступила 18 XI 2010

## NON-HISTONE SKELETON OF MITOTIC CHROMOSOME *IN SITU*

M. S. Makarov, Yu. S. Chentsov

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

Studying giant nuclei of *Chironomus plumosus in situ* (Makarov, Chentsov, 2010), we concluded that polythene chromosome structure appears after 2 M NaCl and DNase treatment in presence of 2 mM CuCl<sub>2</sub>. Cu<sup>2+</sup>-ions may stabilize bonds between specific non-histone components, arranged into non-histone matrix of polythene chromosome. Here, we investigated the non-histone matrix of pig embryo mitotic chromosomes *in situ*, using 2 mM CuCl<sub>2</sub>-stabilization method. In 2 mM CuCl<sub>2</sub> — stabilized cells the residual chromosome body (non-histone matrix) could be visualized in every stage of mitosis. Mitotic chromosome non-histone matrix had the same reaction on preliminary hypotonic treatment as normal chromosome: different decondensation of non-histone material was observed. Topoisomerase IIalpha and SMC 1 had uniform localization inside chromosomal body and did not form any axial structures.

Key words: non-histone proteins, nuclear protein matrix, stabilization, topoisomerase IIalpha, SMC 1.