

А. Д. ГРУЗДЕВ, Г. П. КИЩЕНКО

## ОБ УКЛАДКЕ ДНК В ДИСКАХ ПОЛИТЕННЫХ ХРОСОМ

(Представлено академиком Д. К. Беляевым 2 I 1975)

Основным структурным компонентом хромосом является нить ДНП диаметром около 30 Å. В теле хромосомы она уложена сложным способом, в котором можно выделить несколько иерархических уровней укладки. Судя по результатам рассеяния рентгеновских лучей (<sup>1-3</sup>) и электронно-микроскопических наблюдений (<sup>4</sup>), первым уровнем является спираль диаметром около 100 Å и с шагом 45 Å (<sup>3</sup>) или 120 Å (<sup>1, 2</sup>).

Относительно следующих уровней укладки имеются в основном данные электронной микроскопии. Предполагается, что нить 100 Å уложена в плотно скрученную спираль диаметром 230–250 Å (<sup>5, 6</sup>). Описаны также нити диаметром 500 Å (<sup>7, 8</sup>). Однако не исключено, что нити 250 и 500 Å являются артефактами и возникают в результате набухания или агрегации 100 Å нитей (<sup>4, 9</sup>).

Существование еще более высокого — хромомерного — уровня укладки не вызывает сомнений, поскольку хромомеры обнаруживаются у хромосом в профазе митоза и мейоза, образуют диски политенных хромосом и могут быть выделены из интерфазных ядер (<sup>10</sup>). Однако вопрос о тождественности перечисленных выше образований, о наличии у них одинаковой специфической структуры практически не изучен. Структура метафазных хромосом характеризуется еще более высокими уровнями укладки ДНК (<sup>5</sup>).

В настоящей работе мы попытались определить число уровней укладки ДНК в дисках политенных хромосом. С этой целью измерялась поляризация флюоресценции изолированных политенных хромосом, окрашенных акридиновым оранжевым (АО) и растягиваемых иглами микроманипулятора. Вполне очевидно, что подобные измерения могут дать информацию прежде всего о структуре дисков, поскольку в них сосредоточена основная масса ДНК (<sup>11</sup>), а регистрируемая интенсивность флюоресценции пропорциональна количеству ДНК. Возможности использованного метода вытекают из того обстоятельства, что молекулы АО связываются с ДНК строго определенным образом. А именно, дипольные моменты поглощения и испускания молекул АО оказываются лежащими в плоскости, перпендикулярной оси ДНК (<sup>12</sup>). По этой причине каждому способу укладки ДНК соответствует определенное пространственное распределение диполей и, следовательно, определенная степень поляризации флюоресценции. Далее, мы полагали, что при растяжении хромосомы существующая в ней укладка ДНК будет нарушаться в закономерной последовательности, например, начиная с хромомерного и кончая уровнем 30 Å нитей. Тогда в эксперименте должны наблюдаться закономерные изменения поляризации.

Использованный поляризационный микрофлюориметр принципиально отличался от прибора Дусенбери и Юретца (<sup>13</sup>) тем, что возбуждение флюоресценции производилось плоско поляризованным, а не естественным светом. Соответственно двум направлениям вектора **E** возбуждающей волны — вдоль или перпендикулярно оси хромосомы — измерялись два значения степени поляризации флюоресценции  $P_{\parallel}$  и  $P_{\perp}$ .

Препараты политенных хромосом личинок хирономуса *Chironomus thummi* получали следующим образом. Ядра слюнных желез, выделенные

по методу (14), окрашивались 15 мин. в растворе АО 1 мкг/мл. После отмывки ядер от несвязавшегося красителя в одно из них вводились иглы микроманипулятора таким образом, чтобы концы их воткнулись в одну из трех больших хромосом. Затем расстояние между иглами ступенчато увеличивалось вплоть до разрыва хромосомы или отрыва ее от иглы. На всех этапах работы использовалась среда, содержащая 125 мМ NaCl, 1 мМ CaCl<sub>2</sub> в 0,02 М фосфатном буфере. Первые этапы работы производили на холоду, окрашивание ядер и растяжение хромосом — при комнатной температуре.

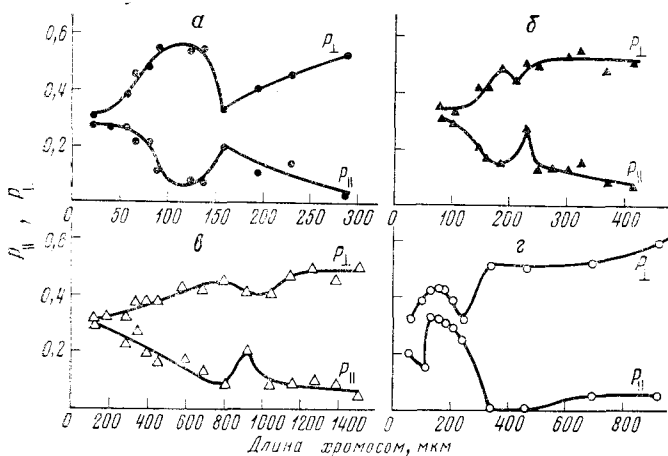


Рис. 1. Изменение поляризации флюоресценции при растяжении политенных хромосом, окрашенных акридиновым оранжевым. а, б, в — нормальные хромосомы, г — предварительно растянутая хромосома

На рис. 1, на котором представлены результаты измерений  $P_{\parallel}$  и  $P_{\perp}$  для четырех хромосом, одна из которых (г) была предварительно растянута, видны следующие особенности. При растяжении хромосом поляризация их флюоресценции закономерно изменяется. Обе кривые ( $P_{\parallel}$  и  $P_{\perp}$ ) при этом изменяются антибатно, проходя через один минимум, один максимум и затем выходят на длительные плато. Исключение составляет предварительно растянутая хромосома (рис. 1г), для которой антибатность наблюдается только при большой степени растяжения. Это свидетельствует о необратимости изменений в структуре хромосом, вызванных их растяжением. Отметим также, что для нерастянутых хромосом (начало графиков) значения  $P_{\parallel}$  и  $P_{\perp}$  практически совпадают.

Однако, несмотря на общее сходство между кривыми для разных хромосом, детали этих кривых, а также масштабы по горизонтальным осям существенно варьируют от хромосомы к хромосоме. Основные причины этого ясны. Во-первых, для измерений использовались неидентифицированные участки любой из трех больших хромосом хирономуса. Во-вторых, расстояние между иглами в начале опыта не стандартизовалось. Отсюда следует, что усреднение результатов разных опытов возможно лишь на том этапе их обработки, когда сравниваются величины при одинаковой степени ориентации ДНК в хромосомах, а не при одинаковой длине или степени растяжения хромосом.

При качественном анализе результатов могут быть получены следующие выводы. Из того факта, что для нерастянутых хромосом  $P_{\parallel} \approx P_{\perp}$ , следует, что укладка ДНК в дисках обладает центральной симметрией и, вероятнее всего, хаотична. Центральная симметрия укладки может быть обусловлена либо хаотичностью расположения хромосомов, образующих диск, либо центральной симметрией укладки ДНК в каждом хромосоме. В пользу последнего предположения свидетельствует тот факт, что первый экстре-

мум кривых  $P_{\parallel}$  и  $P_{\perp}$  возникает при больших (3–8-кратных) степенях растяжения, тогда как для ориентации хромомеров достаточно было бы небольшого растяжения.

Далее, наличие двух экстремумов и последующего за ними широкого плато на кривых  $P_{\parallel}$  и  $P_{\perp}$  качественно согласуется с моделью, согласно которой молекула ДНК уложена внутри хромосомной нити в спираль второго порядка (считая спираль двуцепочечной ДНК спиралью нулевого порядка). В свою очередь, спираль второго порядка уложена в хромомере хаотически или упорядоченно, но центрально-симметрично.

В пользу предложенной модели свидетельствует согласование упаковочных коэффициентов (отношения длины ДНК к длине хромосомы), полученных из прямых измерений и вычисленных из модельных представлений. Действительно, количество ДНК в гаплоидном наборе использованного нами вида *Ch. thummi* 0,28 пг<sup>(15)</sup>, что соответствует длине ДНК 85 000 мкм. Суммарная длина набора политенных хромосом 320 мкм<sup>(16)</sup>. Поэтому упаковочный коэффициент  $K=270$ . С другой стороны, для модели, очевидно,  $K=K_1K_2K_x$ , где  $K_1$  и  $K_2$  суть упаковочные коэффициенты для спиралей, а  $K_x$  — для хромомера. Для модели Пардона<sup>(1)</sup>  $K_1=2,8$ ; для модели Брама<sup>(2)</sup>  $K_1=4,3$ . Значение  $K_2$  для плотной спирали диаметром 250 Å, свернутой из 100 Å нити, равно 8. Наконец, значение  $K_x$  может быть оценено из рис. 1 следующим образом. Очевидно, что полная ориентация спирали второго порядка в растягиваемом хромомере достигается при удлиннениях, соответствующих положению первого экстремума  $P_{\parallel}$  и  $P_{\perp}$  или еще больших. Из сравнения абсцисс начальных точек графиков и их первых экстремумов имеем  $K_x > 5$ . Полное значение  $K > 110-170$  находится в хорошем согласии со значением  $K=270$ , полученным из прямых измерений количества ДНК и длин хромосом.

Проведенные нами расчеты поляризации флюоресценции предложенной модели находятся в качественном согласии с экспериментальными результатами, но требуют усложнения модели. В частности, на первом экстремуме кривых  $P_{\parallel}$  и  $P_{\perp}$  (рис. 1) их значения оказываются заметно меньше (и, соответственно, больше) вычисленных. Мы полагаем, что обнаруженное расхождение может быть объяснено влиянием гистонов, затрудняющих посадку молекул АО на ДНК в некоторых местах спиральной структуры ДНП-нитей.

Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Академии наук СССР  
Новосибирск

Поступило  
2 I 1975

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> J. F. Pardon, M. H. F. Wilkins, B. M. Richards, Nature, v. 215, 5100, 508 (1967).  
<sup>2</sup> B. M. Richards, J. F. Pardon, Exp. Cell Res., v. 62, 1, 184 (1970). <sup>3</sup> S. Brahm, H. Ris, J. Mol. Biol., v. 55, 3, 325 (1971). <sup>4</sup> H. Ris, D. F. Kubai, Ann. Rev. Genetics, v. 4, 263 (1970). <sup>5</sup> Ю. С. Ченцов, В. Ю. Поляков, Ультраструктура клеточного ядра, «Наука», 1974. <sup>6</sup> F. Lampert, P. Lampert, Humangenetik, v. 11, 1, 9 (1970). <sup>7</sup> G. F. Bahr, Exp. Cell Res., v. 62, 1, 39 (1970). <sup>8</sup> K. Tanaka, A. Jino, Exp. Cell Res., v. 81, 1, 40 (1973). <sup>9</sup> A. S. Pooley, J. F. Pardon, B. M. Richards, J. Mol. Biol., v. 85, 4, 533 (1974). <sup>10</sup> J. Sonnenbichler, Nature, v. 233, 5202, 205 (1969). <sup>11</sup> W. Beermann, Development Studies on Giant Chromosomes, 1972. <sup>12</sup> L. S. Lerman, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 49, 1, 94 (1963). <sup>13</sup> J. W. MacInnes, R. B. Uretz, J. Cell Biol., v. 33, 3, 597 (1967). <sup>14</sup> M. N. Robert, Chromosoma, v. 36, 1, 1 (1971). <sup>15</sup> И. И. Кикнадзе, И. Е. Власова, А. И. Шерудило, Цитология, т. 17, № 3 (1975). <sup>16</sup> И. И. Кикнадзе, А. Д. Груздев, Цитология, т. 12, 8, 953 (1970).