

УДК 547.963.3:578.086

ЦИТОЛОГИЯ

В. А. КАДЫКОВ, Ю. Ю. ВЕНГЕРОВ, В. И. ПОПЕНКО,
А. С. ТИХОНЕНКО

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ЭЛЕМЕНТАРНОЙ ФИБРИЛЛЫ ХРОМАТИНА

(Представлено академиком А. А. Баевым 21 V 1975)

В многочисленных исследованиях, посвященных изучению структурной организации фибрилл хроматина как в выделенном состоянии, так и на ультратонких срезах интерфазных ядер, показано, что дезоксирибонуклеопротеидный комплекс (ДНП) в ядрах высших организмов существует в основном в виде фибрилл хроматина толщиной порядка 40—100—200 Å. Однако до настоящего времени нет единого мнения о том, в какой структурно-функциональной связи между собой находятся эти фибриллы и какая из фибрилл является функционально активной. Окончательно не решены вопросы также о числе нитей ДНК, входящих в элементарную фибриллу ДНП, и способе укладки ДНК в ДНП. В ряде работ показана возможность суперспиральной упаковки ДНК в ДНП (^{1, 2}). Электронно-микроскопические исследования, проведенные в работах (^{3, 4}), показали, что фибрилла ДНП хроматина толщиной около 200 Å содержит одну 2-цепочечную нить ДНК, упакованную в этой фибрилле 1:5. К такому же выводу приходят авторы работы (⁵), исследовавшие ДНП ядер гидродинамическими методами.

В настоящем сообщении излагаются результаты электронно-микроскопических исследований, целью которых было выявление функционально активных фибрилл хроматина.

Объектом исследований служил ДНП, выделенный из ядер тимуса теленка при низкой ионной силе в отсутствие хелатирующих агентов (подробное описание метода в работе (⁶)) в некоторой модификации. Модификация метода выделения состояла в том, что до перевода осадка ядер в низкую ионную силу препарат промывали 0,35 М NaCl. Это вызвано тем, что ионная сила в ядре по одновалентным катионам Na⁺ и K⁺ соответствует 0,35 М (⁷).

Параллельно препарат хроматина получали при осмотическом шоке целых ядер на поверхности воды (⁸). Каплю взвеси ядер, находящуюся в 0,14 М NaCl, 0,005 М Mg²⁺, pH 7,6, наносили на поверхность дистиллированной воды. При этом происходил осмотический шок и содержимое ядра более или менее равномерно распределялось по поверхности воды, откуда материал путем соприкосновения сетки с поверхностью переносили на опорные подложки. В некоторых опытах применяли плавное опускание шоката ядер на сетки с пленкой. Излишки материала с опорной пленки удаляли фильтровальной бумагой. Образцы высушивали на воздухе и отеняли напылением сплава Pd—Pt в вакуумной установке. Приготовленный таким образом препарат хроматина изучали в электронном микроскопе JEM-100B фирмы JEOL при 80 кв.

После осмотического шока в препарате обнаруживаются длинные фибриллы ДНП толщиной 100—200 Å (рис. 1а, 1, 2), и лишь незначительная часть фибрилл имеет диаметр 30—40 Å (рис. 1а, 3). Практически все фибриллы имеют выраженную гранулярную структуру (рис. 1а). Размеры гранул колеблются от 100 до 200 Å. Фибриллы ДНП толщиной около 200 Å

не представляют собой однородную по строению нить. Они состоят из тесно прилегающих друг к другу таких гранул. На фибриллах ДНП толщиной 40—100 Å гранулы располагаются менее плотно. Между ними прослеживаются линейные участки ДНП толщиной 30—40 Å, причем длина 30—40 Å участков между гранулами различна. Можно полагать, что гранулы подобны ν -телам хроматина, впервые описанным в работе (9). Согласно модели, предложенной в работе (10), индивидуальное ν -тело представляет собой глобулу, образованную гистонами ($F_{2a1} + F_3$ и $F_{2a2} + F_{2b}$), в которой упакован фрагмент ДНК из 200 пар нуклеотидов (11).

Как отмечают авторы (9), ν -тела выявлялись только при фиксации хроматина формальдегидом. В нашем случае гранулы типа ν -тел наблюдались также и без применения фиксаторов. Однако они имеют несколько большие размеры (100—200 Å) по сравнению с размерами ν -тел (60—80 Å). Тем не менее, как обнаруженные нами гранулы, так и ν -тела хроматина по размерам укладываются в один порядок величин. Различие же в размерах можно объяснить другими экспериментальными условиями выделения хроматина.

При изучении участков фибрилл хроматина толщиной 30—40 Å было замечено, что от них отходят гроздевидные структуры, состоящие из связанных между собой отдельных глобул (рис. 1а). Как правило, гроздевидные структуры отходят от фибрилл хроматина в перпендикулярном направлении и выглядят беспорядочно перепутанными в препаратах хроматина, полученных осмотическим шоком ядер (рис. 1б), и линейно вытянутыми при исследовании растворимого ДНП (рис. 1в). При обработке фибрилл хроматина РНКазой непосредственно на пленке-подложке, такие гроздевидные структуры распадаются на отдельные глобулы, совпадающие по размерам и форме с ядерными РНП-частицами (12) (рис. 1г). По аналогии с данными, опубликованными в работе (13), можно думать, что наблюдаемые линейно вытянутые участки ДНП толщиной 30—40 Å в фибриллах хроматина могут участвовать в процессах транскрипции, а гроздевидные структуры, отходящие от них, являются результатом транскрипции.

Таким образом, можно предположить, что в функционально активном состоянии хроматин в ядрах высших организмов представлен в виде линейно вытянутых, лишенных гранул участков ДНП толщиной 30—40 Å.

Количество гранул вдоль фибрилл ДНП может отражать различную степень компактизации (суперскрученности) ДНК по длине фибриллы. Можно полагать, что суперскрученность ДНК в ДНП необходима для осуществления одного из возможных механизмов регуляции функционирования генома высших организмов.

Институт молекулярной биологии
Академии наук СССР
Москва

Поступило
13 V 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. F. Pardon, M. N. F. Wilkins, B. M. Richards, Nature, v. 215, 508 (1967).
- ² S. Bram, H. Ris, J. Mol. Biol., v. 55, 325 (1971). ³ Е. П. Сенченков, В. А. Кадыков, Ю. С. Ченцов, Тез. II Всесоюз. симпозиума по структуре и функции хромосомы, Новосибирск, 1970. ⁴ В. А. Кадыков, Г. Я. Коломийцева и др., Матер. IX Всесоюз. конфер. по электр. микроскопии, Тбилиси, 1973. ⁵ P. Henson, J. O. Wolker, Europ. J. Biochem., v. 22, 1 (1971). ⁶ В. А. Кадыков, Г. Я. Коломийцева и др., Молек. биол., т. 7, 2, 232 (1973). ⁷ В. Ю. Поляков, К. А. Луста, Ю. С. Ченцов, Матер. IV Всесоюз. симпозиума по структуре и функции клеточн. ядра, Тбилиси, 1972. ⁸ J. G. Gall, Sci., v. 199, 120 (1963). ⁹ F. L. Olins, Science, v. 183, 330 (1974). ¹⁰ K. E. Van Holde, C. G. Sahasrabudde, Barbara Ramsay Shaw, Nucl. Acids Res., v. 1, 11 (1974). ¹¹ R. D. Kornberg, Sci., v. 184, 867 (1974). ¹² О. П. Самарина, Е. М. Луканидин, Г. П. Георгиев, Молек. биол., т. 2, 1, 79 (1968). ¹³ B. A. Hamkalo, O. L. Miller jr., Ann. Rev. Biochem., v. 42, 379 (1973).

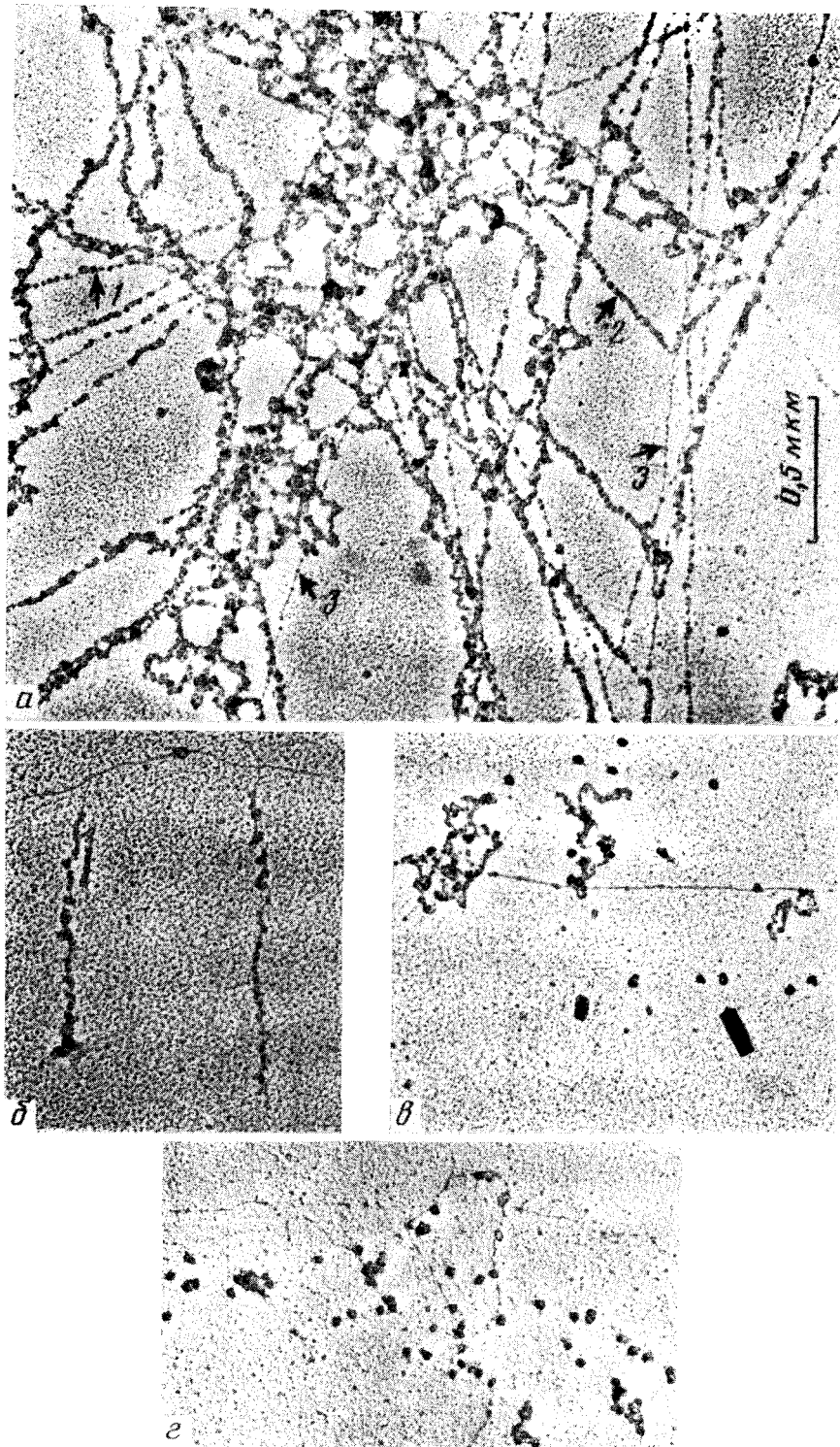


Рис. 1. *a* — микрофотография фибрилл хроматина, полученная после осмотического шока ядер тимуса теленка на поверхности водного мениска: 1, 2 — фибриллы ДНП толщиной 100–200 Å, 3 — фибриллы ДНП толщиной 40 Å; *б* — *в* — микрофотографии фибрилл хроматина с отходящими от них гроздевидными структурами, полученные: *б* — после осмотического шока ядер на поверхности водного мениска, *в* — при исследовании растворимого ДНП, *г* — после обработки РНКазой. Контрастирование напылением сплава Pt+Pd в вакуумной установке на вращающемся столике. Угол напыления 6°, 40 000×