

# Сравнительный анализ нуклеосомной структуры клеточных ядер — малоугловое нейтронное рассеяние

© В.В. Исаев-Иванов<sup>\*,\*\*</sup>, Д.В. Лебедев<sup>\*,\*\*</sup>, Х. Лаутер<sup>\*\*\*</sup>, Р.А. Пантина<sup>\*</sup>,  
А.И. Куклин<sup>\*\*\*\*</sup>, А.Х. Исламов<sup>\*\*\*\*</sup>, М.В. Филатов<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup> Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова РАН,  
Гатчина, Ленинградская обл., Россия

<sup>\*\*</sup> Научно-образовательная структура „Биофизика“ СПбГУ и ПИЯФ РАН,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>\*\*\*</sup> Институт Макс фон Лауэ и Пауля Ланжевена,  
Гренобль, Франция

<sup>\*\*\*\*</sup> Объединенный институт ядерных исследований,  
Дубна, Московская обл., Россия

E-mail: isaev@omrb.pnpi.spb.ru

Методом малоуглового рассеяния нейтронов исследована нуклеосомная структура в нативных ядрах нормальных (эритроциты курицы (ЯЭК) и лейкоциты крыс (ЯЛК)) и аномально (клетки линии аденокарциномы шейки матки человека HeLa и фибробласты китайского хомячка линии A238) пролиферирующих клеток. Полученные авторами экспериментальные результаты позволяют сделать вывод о том, что для ЯЭК и ЯЛК параметры нуклеосомной структуры (в среднем по ядру) близки к общепринятым значениям, а функция распределения по расстояниям (ФРР), получаемая из кривых рассеяния, является бимодальной. Бимодальность ФРР отражает неширокое распределение расстояний между нуклеосомами (в среднем по ядру) в фибрильном уровне организации хроматина. Гистоновый кор нуклеосомной структуры в ядрах клеток HeLa и A238 в среднем по ядру находится в состоянии существенно менее компактном, чем у ЯЭК и ЯЛК, а ФРР признаков бимодальности не имеет.

## 1. Введение

Одна из проблем клеточной и молекулярной биологии, которая интенсивно изучается последнее время, это связь структурной динамики нуклеосом с регуляцией основных молекулярных механизмов, обеспечивающих жизнедеятельность и деление клетки, таких как транскрипция, репликация, репарация ДНК. К структурной динамике принято относить как процессы ацетилирования, метилирования и фосфорилирования гистоновых белков нуклеосомного кора, так и перемещение нуклеосом целиком вдоль ДНК с помощью ремоделирующих белков [1–3].

Общепринятые понятия о нуклеосомной структуре основаны на результатах рентгеноструктурного анализа [4,5], на данных, полученных с помощью электронной [6], атомно-силовой микроскопии (АСМ) [7] и других методов. Во всех этих случаях производится либо препаративная экстракция нуклеосомных структур [7] той или иной степени сложности из состава хроматина ядра клетки, либо осуществляется сборка *in vitro* нуклеосомной структуры из гистоновых белков и известных последовательностей ДНК [8]. Основой нуклеосомной частицы служит кор из восьми гистоновых белков, на котором намотано около двух витков двунитовой ДНК. Межнуклеосомная связь осуществляется за счет линкерной ДНК и гистонового белка H1. Основными параметрами нуклеосомной структуры в составе хроматина можно считать средний размер белкового кора, самой нуклеосомной частицы и распределение расстояний между центрами нуклеосомных частиц. Так, в работе [7] при исследованиях фибрильной структу-

ры хроматина методом АСМ основная информация о нуклеосомной структуре сводилась к получению распределения расстояний между центрами нуклеосомных частиц. При этом хроматин экстрагировался из ядра до уровня фибрильной организации. Следующий уровень организации нуклеосом в составе хроматина ядра — соленоидальный, или типа „зигзаг“, связан именно с таким параметром, как расстояние между центрами нуклеосомных частиц, потому что он должен определять диаметр фибрильной структуры. Пока фибрильный уровень организации хроматина в составе нативного ядра клетки остается дискуссионным, хотя данных в пользу структуры зигзаг последнее время становится больше. Более того, в нативных условиях упаковки хроматина, в составе целого ядра, существование фибрильной 30 nm структуры подвергается сомнению [9]. Считается, что она может быть продуктом препаративных процедур выделения части хроматина из состава ядра.

Нельзя исключить вероятность того, что параметры нуклеосомной структуры в составе хроматина целого ядра, такие как средний по ядру размер нуклеосомной частицы и распределение расстояний между центрами нуклеосомных частиц в ядре, могут быть другие величины, чем параметры тех же нуклеосом, экстрагированных из ядра. При этом необходимо помнить, что нуклеосомная структура в составе ядра живой клетки динамична. Модификация гистоновых белков должна приводить к увеличению эффективного размера нуклеосомной частицы. С другой стороны, в области работы молекулярных комплексов транскрипции, репликации, репарации нуклеосомный гистоновый кор может быть в состоянии, диссоциированном на димеры (H2A-H2B) и тетрамеры

(НЗ-Н4)<sub>2</sub>. Для нормального ядра, находящегося в интерфазе, уровень транскрипционной активности невысок, и поэтому доля нуклеосом в разобранном состоянии, видимо, невелика. Другое дело аномально пролиферирующие, злокачественно трансформированные клетки. Известно, что в них уровень транскрипционной активности высок, и в силу этого доля нуклеосом с измененной структурой может существенно отличаться от нормальных ядер. В этом случае возмущения в нуклеосомной организации хроматина в целом по ядру могут быть значительными.

С учетом указанного выше возникает задача сравнительного анализа средних по ядру параметров нуклеосомной структуры в нормальных и злокачественно трансформированных клетках.

Физическим методом, позволяющим получать информацию о структурной организации хроматина в среднем по ядру, является малоугловое рассеяние нейтронов (МУРН). Для нуклеосомной структуры в составе хроматина ядра из экспериментальных кривых МУРН принципиально возможно оценить функции распределения для межнуклеосомных расстояний. Именно такая информация была получена в работе [10] для ди- и тринуклеосомных частиц, которые были препаративно выделены из хроматина ядер клеток эритроцитов куриц (ЯЭК) и почек обезьян (COS-7). В силу „гантельного“ характера нуклеосомной структуры [11] функции распределения по расстояниям, полученные авторами, имели бимодальный характер, из которого можно было определить моонуклеосомные и межнуклеосомные распределения.

В настоящей работе приводятся структурные данные об упаковке нуклеосом в составе хроматина целых ядер, полученные методом МУРН.

## 2. Материалы и методы

2.1. Приготовление образцов. Работа выполнена на ядрах эритроцитов куриц, лейкоцитах селезенки крыс, культивируемых клеток аденокарциномы шейки матки человека HeLa, перевиваемый линии клеток фибробластов китайского хомячка A238.

2.1.1. Выделение ядер клеток эритроцитов курицы. Кровь куриц получали, используя гепарин (50 units/ml) в качестве антикоагулянта. Эритроциты куриц получали многократной отмывкой от белков плазмы крови с помощью центрифугирования в изотоническом фосфатном буфере (pH = 7.4), содержащем 10 mM этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). Ядра приготавливали путем лизиса мембран неионным детергентом Тритон X-100 (0.2% раствор в фосфатном буфере с pH = 7.4). В результате после 5 min обработки этим детергентом происходило растворение цитоплазматической и ядерной мембран. Выделение ядра фиксировали обработкой 0.05% раствором глутарового альдегида в течение 10 min, после чего фиксатор отмывали центрифугированием. Ядра хранились при 4°C в изотоническом фосфатном буфере, содержащем 50 mM ЭДТА. Для

оценки сохранности ядер их пробные образцы окрашивались бромистым этидием (50 µg/ml) и анализировались с помощью проточного цитофлуориметра с аргонным лазером в качестве источника света ( $\lambda = 488 \text{ nm}$ ). С целью выяснения, как влияет процедура фиксации ядер глутаровым альдегидом на структуру хроматина, нами были получены кривые рассеяния нейтронов для ядер, не обработанных и обработанных глутаровым альдегидом. Для концентрации глутарового альдегида (0.05%), которая использовалась в наших препаративных процедурах, кривые рассеяния, полученные на ядрах с фиксированной структурой, практически не отличались от аналогичных кривых для ядер, не обработанных глутаровым альдегидом [12].

2.1.2. Выделение ядер клеток лимфоцитов крыс (ЯЛК). Для получения лейкоцитов селезенки крысы усыплялись хлороформом, селезенка изолировалась и помещалась в изотонический фосфатный буфер с pH = 7.4, содержащий 10 mM ЭДТА. Высвобождение клеток проводилось механической деструкцией органа. Удаление фрагментов ткани проводилось самопроизвольным оседанием в течение 5 min. Полученная суспензия неосевших клеток фракционировалась с помощью центрифугирования через раствор фикола с плотностью 1.077. Оставшиеся на поверхности фикола лейкоциты представляли собой в основном лимфоциты. Ядра приготавливались путем лизиса мембран неионным детергентом Тритон X-100 и фиксацией глутаровым альдегидом так же, как это делалось для эритроцитов куриц.

2.1.3. Выделение ядер клеток HeLa и A238. Клетки HeLa и A238 выращивались в среде, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки. После перевода в суспензию в изотоническом фосфатном буфере (pH = 7.4) клетки обрабатывались Тритоном X-100 и фиксировались глутаровым альдегидом так же, как это было описано для эритроцитов куриц.

2.1.4. Обработка ядер бромистым этидием. Для возмущения структуры хроматина в ряде экспериментов ядра клеток обрабатывались высокими концентрациями интеркалирующего в ДНК агента — бромистого этидия. Обработка проводилась сразу после получения ядер и до фиксации глутаровым альдегидом. Ядра обрабатывались раствором бромистого этидия (250 µg/ml) в стандартном фосфатном буфере в течение 10 min, после чего фиксировались глутаровым альдегидом, а избыток несвязанного интеркалятора удалялся повторным центрифугированием.

2.2. Малоугловое рассеяние нейтронов. Все пилотные измерения МУРН после отработки препаративных процедур на клеточных ядрах были выполнены на времяпролетном спектрометре ЮМО (ОИЯИ, Дубна, Россия). Сравнительные измерения ядер клеток эритроцитов курицы, лимфоцитов крыс, HeLa и линии A238 как в нативном состоянии, так и при различных указанных выше обработках клеток были осуществлены на спектрометре МУРН D-11 (ИЛЛ, Гренобль, Франция).

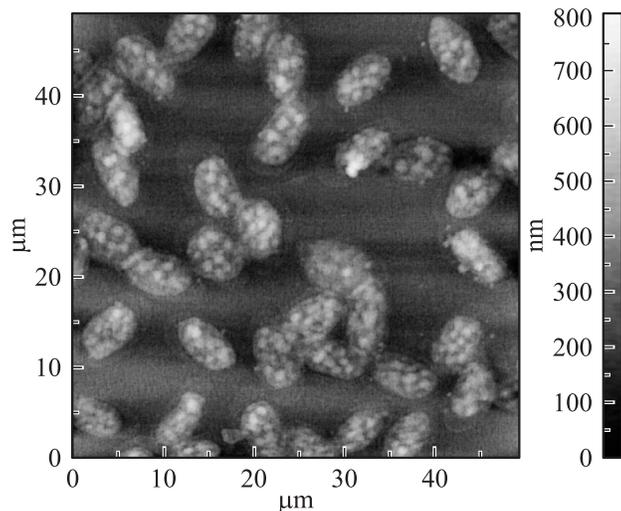


Рис. 1. Рельеф поверхности ядер эритроцитов курицы.

Измерения на спектрометре ЮМО проводились в диапазоне длин волн  $0.7\text{--}6\text{ \AA}$ . Пучок был коллимирован до  $14\text{ mm}$  диаметра на образце. Предварительная обработка данных проводилась по схеме, изложенной в [13]. Регистрация рассеяния осуществлялась двумя детекторами одновременно в области  $Q = 0.006\text{--}0.15\text{ \AA}^{-1}$ .

Измерения на спектрометре малоуглового рассеяния D-11 (Институт Лауэ–Ланжевена, Гренобль, Франция) были выполнены при длине волны нейтронов  $8\text{ \AA}$  и двух

положениях детектора  $2.5$  и  $10\text{ m}$ , что обеспечило диапазон рассеянных векторов от  $0.002$  до  $0.14\text{ \AA}^{-1}$ . Образцы размещались в  $1\text{ mm}$  кюветках, измерения проводились при комнатной температуре. Все измерения проводились в буферном растворе, содержащем до  $5\text{ mM}$  ЭДФ при концентрации ядер  $5\text{--}10\%$  по весу; в качестве фона измерялось рассеяние буферным раствором с соответствующим содержанием  $\text{D}_2\text{O}$ .

Для преобразования кривых МУРН в той их части, которая соответствует нуклеосомной структуре, в функцию распределения по размерам использовалась программа GNOM, представленная на сайте [14]. Для обработки по этой программе использовалась часть кривых рассеяния в диапазоне переданных импульсов  $Q$  от  $0.017$  до  $0.14\text{ \AA}^{-1}$  для кривых МУРН, полученных на установке D11, и от  $0.017$  до  $0.4\text{ \AA}^{-1}$  для установки ЮМО.

2.3. Контроль целостности и гомогенности получаемых ядер. Так как целью настоящей работы является исследование структурных параметров нуклеосомной упаковки хроматина в составе целых ядер высших эукариот, важная часть работы состоит в контроле целостности и гомогенности ядер, а также в контроле нативности исследуемой структуры в результате препаративных процедур.

Контроль целостности исследуемых ядер осуществляли с помощью атомной силовой микроскопии (Solver Bio, фирма NT-MDT, Зеленоград, Россия). Для измерений на АСМ отбиралось небольшое количество фикси-

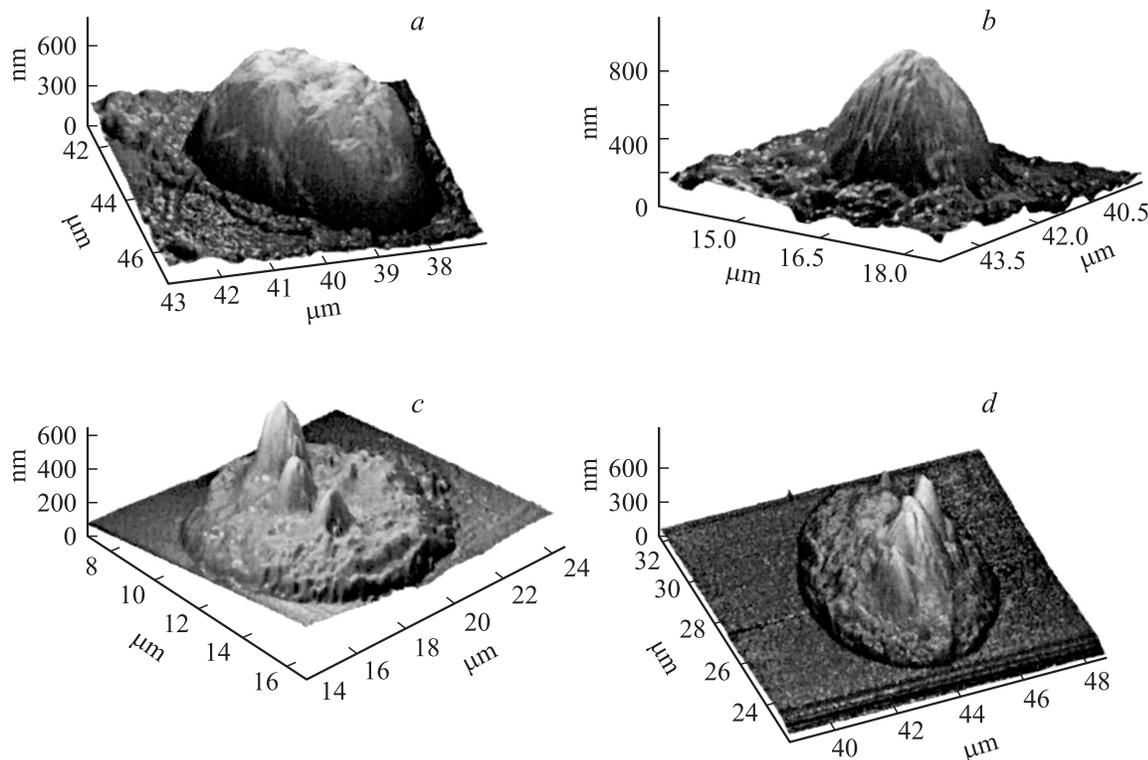
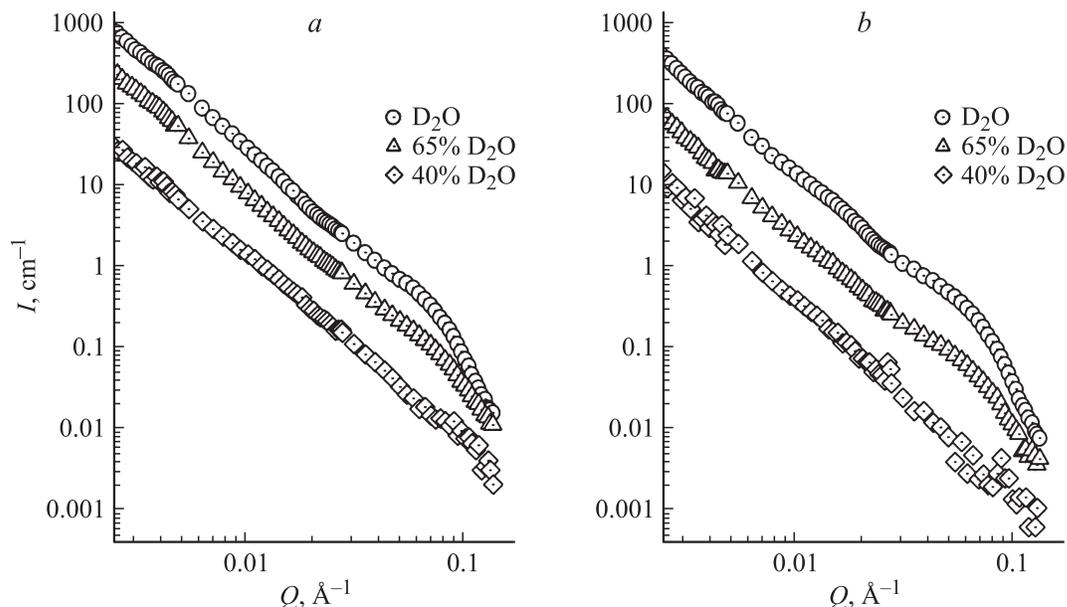


Рис. 2. Рельеф поверхности ядер клеток эритроцитов курицы (a), лимфоцитов крыс (b), HeLa (c) и A238 (d).



**Рис. 3.** Кривые МУРН нативных ЯЭК (а) и ЯЛК (b) в области нуклеосомной структуры хроматина ядер в фосфатном буфере, содержащем 40, 65 и > 98 wt. % D<sub>2</sub>O.

рованных ядер, которые отмывались в стократном избытке дистиллированной H<sub>2</sub>O путем центрифугирования в течение 10 min. Полученный осадок ресуспендировался в небольшом количестве H<sub>2</sub>O, наносился на предметное стекло и сушился на воздухе в чашке Петри. Вначале регистрировалось обзорное изображение, как это показано на рис. 1 для ядер эритроцитов курицы, а затем регистрировалось несколько изображений одиночных ядер. Изображения одиночных ядер клеток эритроцитов курицы, лимфоцитов крыс, HeLa и линии A238, полученные с помощью АСМ после выделения и фиксации глутаровым альдегидом, приведены на рис. 2, а–d соответственно.

Данные цитофлюорометрии показали, что препараты состояли из однородных ядерных частиц, содержащих одинаковое количество ДНК (коэффициент вариации по ДНК не превышал 2%). Данные, приведенные в работе [12], показали, что кривые процедуры фиксации 0.05% раствором глутарового альдегида практически не влияют на спектры малоуглового рассеяния, указывая, что в диапазоне до нескольких сотен ангстрем упаковка хроматина в составе исследуемых ядер нечувствительная к нашим фиксационным процедурам.

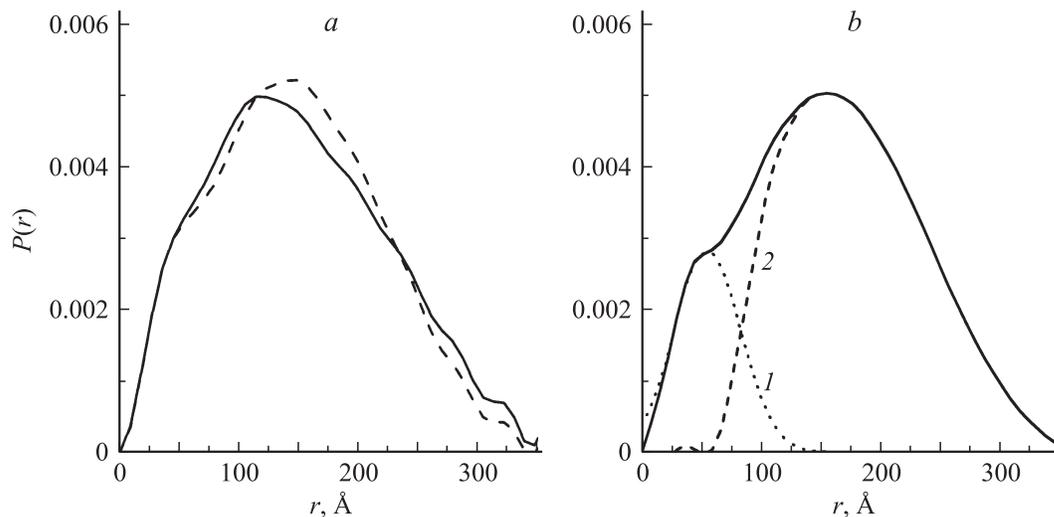
### 3. Результаты

На рис. 3 приведены кривые МУРН, полученные для ЯЭК и ЯЛК, которые выделены из нативных клеток. Кривые рассеяния находятся в диапазоне величин рассеянных векторов  $Q = 0.01–0.15 \text{ \AA}^{-1}$ , который близок к аналогичным кривым, приведенным в работе [10]. Это облегчает сравнение формы кривых МУРН, приведенных в [10] для ди- и тринуклеосомных частиц, с

кривыми рассеяния, полученными нами на целых ядрах в этом же диапазоне  $Q$ . Кроме того, для каждого типа ядер приведены результаты контрастирования — кривые рассеяния при 65 и 40% содержания D<sub>2</sub>O. Точке компенсации нуклеиновой компоненты хроматина соответствует 65% содержание D<sub>2</sub>O, и кривые МУРН несут в этом случае информацию о структуре белковой компоненты хроматина. 40% содержание D<sub>2</sub>O соответствует точке компенсации белка, и кривые МУРН соответственно несут информацию о структуре нуклеиновой компоненты хроматина (ДНК + РНК) [11].

Как видно из приведенного рисунка, кривые рассеяния для ЯЭК и ЯЛК качественно похожи. В D<sub>2</sub>O у обоих типов ядер кривые рассеяния имеют слабовыраженный пик при величине рассеянного вектора  $Q \sim 0.06 \text{ \AA}^{-1}$  и слабую ондуляцию в области  $Q \sim 0.03 \text{ \AA}^{-1}$ . Такую же форму имеют кривые рассеяния нейтронов на ди- и тринуклеосомных частицах, выделенных из хроматина ядер клеток эритроцитов курицы и клеток почек обезьян COS-7 [10]. При этом слабовыраженный пик регистрировался при  $Q \sim 0.04 \text{ \AA}^{-1}$ , а слабая ондуляция в области  $Q \sim 0.02 \text{ \AA}^{-1}$ . Такая форма кривых рассеяния характерна для структур гантельного типа [11], каковой и является нуклеосомная структура в случае ди- и тринуклеосомных частиц. Как показано авторами в работе [10] путем симуляции кривых рассеяния, величина пика и глубина ондуляции в форме кривой рассеяния нейтронов зависит от величины межнуклеосомного расстояния. Чем больше межнуклеосомное расстояние, тем рельефнее эти особенности в форме кривой МУРН на ди- и тринуклеосомных частицах.

Вторая общая особенность кривых рассеяния, приведенных на рис. 3, состоит в том, что контрастирование для обоих типов ядер дает качественно одинаковые



**Рис. 4.** *a)* Бимодальный характер функции распределения по расстояниям для ЯЭК (сплошная линия) и ЯЛК (штриховая линия) в области нуклеосомной структуры хроматина. Данные нормированы на интеграл функции по  $r$ . *b)* Приближение функции распределения для ЯЛК линейной комбинацией гауссовой функции (1) и функции распределения межнуклеосомного расстояния (2).

результаты. Как видно из рис. 3, в 65%  $D_2O$ , когда кривая рассеяния нейтронов обусловлена белковой компонентой структуры хроматина, форма кривых для обоих типов ядер сохраняет те же особенности, что и в  $D_2O$ : явно выраженный пик и ондуляция.

Форма кривой рассеяния при 40% содержании  $D_2O$  (нуклеиновая компонента структуры хроматина) не имеет пика в области  $Q \sim 0.06 \text{ \AA}^{-1}$  и ондуляции при  $Q \sim 0.03 \text{ \AA}^{-1}$ , а имеет степенную зависимость вида  $I \sim Q^{-D}$  (фрактальный режим кривой рассеяния) с показателем  $D = 2.27$  и  $2.44$  для ЯЭК и ЯЛК соответственно. Этот результат совпадает с данными, приведенными в работе [12], в которой показан фрактальный режим кривой рассеяния нейтронов для нуклеиновой компоненты хроматина целых ядер из клеток эритроцитов курицы.

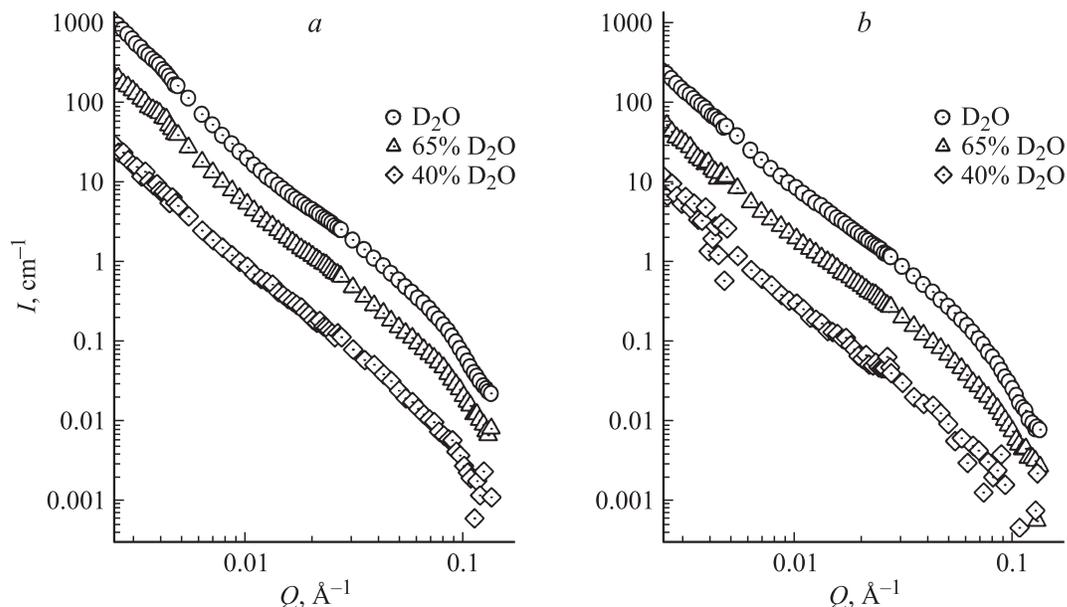
Приведенные данные позволяют сделать вывод о том, что белковая компонента хроматина вносит основной вклад в форму кривой рассеяния ЯЭК и ЯЛК в  $D_2O$  в области  $Q \sim 0.06 \text{ \AA}^{-1}$ . Этот вывод совпадает с результатами работы [10].

Как отмечалось выше, динуклеосомная структура по принципу организации в смысле распределения рассеивающего вещества для МУРН есть структура типа „гантель“ [11]. Для такой структуры функция распределения по расстояниям, которую можно получить из кривой рассеяния, имеет бимодальную форму. Одна из мод этого распределения соответствует распределению рассеивающего материала внутри нуклеосомы (моонуклеосомное распределение), а другая мода — распределению расстояний между нуклеосомами (межнуклеосомное распределение). Для ди- и тринуклеосомных частиц в работе [10] авторы получили функцию распределения по расстояниям из экспериментальных кривых рассеяния и сделали оценку моонуклеосомного и межнуклеосомного распределения по расстояниям.

В нашем случае кривые МУРН получены на целых ядрах в области величин рассеянных векторов, которая соответствует нуклеосомной структуре и супернуклеосомной на размерах порядка размеров фибрилл  $\sim 350 \text{ \AA}$ . В этом случае упаковка хроматина такова, что каждая нуклеосома находится в окружении нескольких соседних нуклеосом. Это должно приводить к тому, что интенсивность моды в функции распределения по расстояниям, которая соответствует межнуклеосомному распределению, должна быть существенно больше, чем мода, соответствующая моонуклеосомному распределению, по сравнению с ди- и тринуклеосомными частицами. Кроме того, на форму функции распределения по расстояниям будут влиять более детальные нуклеосомы („дальний порядок“) и средняя по ядру плотность упаковки нуклеосом (распределение длины линкерных расстояний).

На рис. 4, *a* приведены функции распределения по расстояниям для ЯЭК и ЯЛК в  $D_2O$ -буфере, полученные из кривых МУРН, приведенных на рис. 3, с помощью программы GNOM. Первый качественный вывод, который следует из рисунка, состоит в том, что форма приведенных кривых соответствует бимодальному характеру распределения по расстояниям. И в том и другом случае характерные черты бимодального распределения носят одинаковый характер. Левое плечо бимодальной функции распределения относится к моонуклеосомному распределению, а пик — к межнуклеосомному распределению по расстояниям. Необходимо отметить, что точность положения пика, отвечающего за межнуклеосомное распределение в различных экспериментах, составляла 5–7% от средней величины.

Функция распределения по расстояниям  $P(r)$ , приведенная в [10] для динуклеосом, имеет два явно выраженных пика, характерные для бимодального распределения. При этом пик, соответствующий межнуклеосомному



**Рис. 5.** Кривые МУРН ЯЭК (а) и ЯЛК (b), обработанных интеркалятором EtBr в фосфатном буфере, содержащем 40, 65 и > 98 wt.% D<sub>2</sub>O.

распределению по расстояниям, составляет порядка 0.53 от интенсивности пика, характеризующего мононуклеосомное распределение по расстояниям. В случае три-нуклеосомных частиц это соотношение увеличивается до 0.75. В составе хроматина целого ядра, как это видно из рис. 4, соотношение интенсивности пиков бимодального распределения достигает 1.8 в пользу межнуклеосомного распределения по расстояниям. Если предположить, что увеличение количества ближайших соседей на одного увеличивает, как в работе [10], соотношение интенсивностей бимодальных пиков в пользу межнуклеосомного на 0.2 величины, то в составе хроматина целого ядра количество ближайших соседей в окружении каждой нуклеосомы, которые дают вклад в пик межнуклеосомного распределения, оказывается порядка 6–7 нуклеосом. Так как пик межнуклеосомного распределения находится в области 150 Å, это означает, что в сфере радиусом 150 Å находится порядка 7–8 нуклеосом.

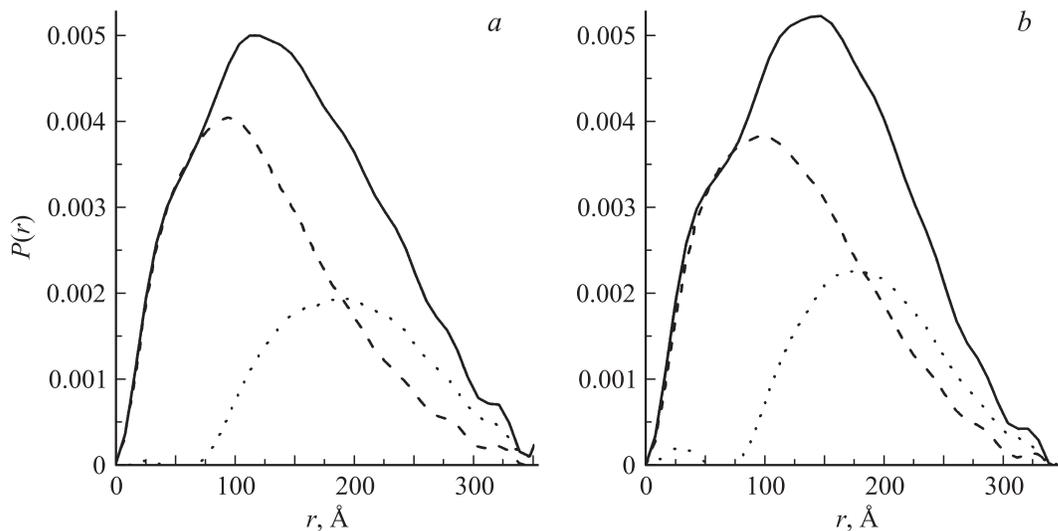
Мононуклеосомная и межнуклеосомная функции распределения по расстояниям не коррелируют друг с другом и поэтому в бимодальное распределение входят аддитивно. Чтобы охарактеризовать полностью бимодальное распределение, необходимо знать хотя бы одно из них, чтобы вычитанием получить второе. На рис. 4, а показано одно из возможных разделений экспериментального бимодального распределения на составляющие моды без дополнительной информации о них. При использовании в качестве мононуклеосомного распределения гауссовой функции, у которой левая половина совпадает с левым плечом экспериментальной бимодальной функции распределения, путем вычитания получено распределение по межнуклеосомным расстояниям. Так как использованная в качестве мононуклеосомного распределения гауссова функция спадает быстро, положение

пика, полученного вычитанием межнуклеосомного распределения, совпадает с пиком экспериментального бимодального распределения. Реально мононуклеосомное распределение может и не быть гауссовой функцией и иметь асимметричную форму.

Для того чтобы оценить влияние взаимодействия ДНК с белковым кором нуклеосом на характер кривых МУРН и функцию распределения по расстояниям, нами был использован интеркалирующий в ДНК агент EtBr, который, как хорошо известно, нарушает стэкинг-взаимодействие между основаниями ДНК и тем самым меняет взаимодействие ДНК — гистоновый кор нуклеосом. На рис. 5, а, b соответственно приведены результаты измерения МУРН на ФЭК и ЯЛК, подвергнутых обработке интеркалятором ДНК EtBr. Качественные отличия этих кривых МУРН от кривых, полученных для контрольных ядер обоих типов, состоит в том, что кривые МУРН контрольных ядер имеют явно выраженные пик и осцилляции, в то время как кривые МУРН, полученные на тех же ЯЭК и ЯЛК после обработки EtBr, становятся более гладкими (рис. 5, а, b).

Изменения в форме кривых рассеяния особенно отчетливо проявляются при сравнении функций распределения по расстояниям. Как видно из рис. 6, для обоих типов ядер их обработка интеркалятором приводит к тому, что функция распределения по расстоянию теряет признаки бимодальности. При этом положение пика мономодального распределения в обоих типах ядер оказывается в области 95 Å, а сам пик асимметричен.

Известно, что нуклеосомная частица является стабильным нуклеопротеидным комплексом за счет того, что между гистоновыми белками нуклеосомного кора и намотанной на него ДНК существует порядка 240 прямых и не прямых точек контакта [15]. При интеркаляции



**Рис. 6.** Влияние интеркалятора на функции распределения по расстояниям для ЯЭК (а) и ЯЛК (б). Сплошные линии — контрольные ядра, штриховые линии — ядра, обработанные бромистым этидием (50 мМ). Пунктирными линиями в обоих случаях показана разность  $P(r)$  контрольных и обработанных интеркалятором ядер, аппроксимирующая функцию межнуклеосомного распределения по расстояниям.

нарушается стэкинг-взаимодействие между основаниями двунитевой ДНК. При этом разрушается структура двойной спирали и вместе с ней и взаимодействие с кором гистоновых белков, что может приводить к дестабилизации белкового кора и увеличению его в размерах. В работе [16] методом дифференциальной сканирующей калориметрии изучалось влияние интеркаляции EtBr на процесс деконденсации ядерного хроматина по изменению положения и формы пиков теплового поглощения при плавлении структур хроматина. Авторы показали, что интеркаляция EtBr в ДНК приводит к изменениям в высоких порядках упаковки хроматина в виде релаксации его петель за счет изменений в межнуклеосомных взаимодействиях, дестабилизации и удлинения линкерных участков ДНК и изменения в коровых частицах нуклеосом.

Можно предположить, что дестабилизация гистонового кора, с одной стороны, и удлинение линкерных участков ДНК — с другой, при интеркаляции EtBr приводят к тому, что функция распределения по расстояниям становится одномодальной. Это происходит в силу того, что удлинение линкерных участков и нарушение межнуклеосомных взаимодействий приводят к нарушению нативной структуры высших порядков, что в свою очередь уменьшает интенсивность правого крыла бимодальной функции  $P(r)$  нативных ядер, а оставшийся одномодальный пик характеризует средний размер дестабилизированных нуклеосомных частиц.

При таких предположениях можно сделать оценку распределения по расстояниям для структур хроматина ЯЭК и ЯЛК, которые в результате нарушения межнуклеосомных взаимодействий при интеркаляции EtBr отсутствуют в одномодальной функции распределения по расстояниям для ядер, которые обрабатывались EtBr.

На рис. 6 получено такое распределение по расстояниям путем вычитания из  $P(r)$  контрольных ядер функции распределения по расстояниям для ядер, обработанных EtBr (нормированной по величине  $P(r)$  при  $r = 50 \text{\AA}$ ).

Авторы отдадут себе отчет в том, что проведенная процедура носит оценочный характер. Однако хотелось бы отметить, что полученное таким образом распределение по расстояниям близко по своим параметрам к распределению, которое было получено в работе [10] для межнуклеосомных расстояний для ди- и тринуклеосомных частиц в растворе.

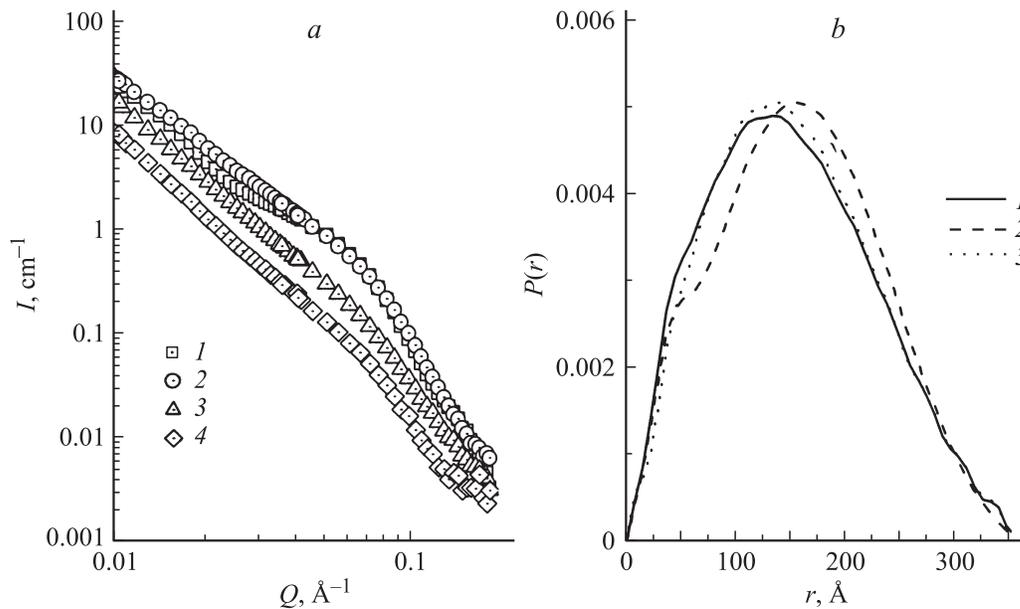
Суммируя результаты, полученные методом МУРН в диапазоне рассеянных векторов  $Q$  от  $10^{-2}$  до  $0.2 \text{\AA}^{-1}$  на целых ядрах, выделенных из нативных клеток ЯЭК, и ядрах, выделенных из клеток, которые могут нормально пролиферировать ЯЛК, можно утверждать следующее.

1) Для обоих типов ядер как в форме кривых МУРН (пик и ондуляция), так и в форме функции распределения по расстояниям (бимодальность) проявляется нуклеосомная структура в упаковке хроматина целого ядра.

2) Контрастирование белковой и нуклеиновой компоненты хроматина в составе ядер показывает, что основной вклад в форму кривых рассеяния по величине контраста вносит белковый кор нуклеосомной структуры.

3) Основные параметры нуклеосомной структуры в составе хроматина целых ядер (моно- и межнуклеосомное распределение по расстояниям) близки по своим величинам для обоих типов ядер.

4) Обработка клеток интеркалятором EtBr приводит к одинаковому изменению в нуклеосомной структуре хроматина обоих типов ядер — функция распределения по расстояниям становится одномодальной.



**Рис. 7.** Сравнение спектров МУРН (а) и функции распределения по расстояниям (б) для ЯЭК (1), ЯЛК (2) и ядер клеток HeLa (3) и A238 (4) ( $P(r)$  для A238 не приведено ввиду низкой интенсивности рассеяния в соответствующем диапазоне  $Q$ ) в  $\text{D}_2\text{O}$ .

Как отмечалось выше, особенностью метода МУРН в жидкости является усреднение по всем ориентациям рассеивающей структуры. В нашем случае это означает, что наблюдаемые выше параметры нуклеосомной структуры характеризуют эту структуру как среднее ее состояние по ядру клетки в момент выделения ядер. Вследствие динамичности во времени нуклеосомной структуры это как бы стационарная концентрация нуклеосом в их стандартном проявлении в составе хроматина целого ядра. В современных моделях динамики нуклеосомной структуры рассматривается возможность диссоциации нуклеосомного гистонового кодра на димеры H2A-H2B и тетрамеры (H3-H4)<sub>2</sub> как в области репликационной вилки [1], так и в области работы транскрипционного комплекса [3]. Если принимать возможность существования такого или похожего типа модели, в которых возможно „расплавление“ (или диссоциация) гистонового кодра на его составляющие, то интенсивность кривой МУРН в области нуклеосомного пика ( $Q \sim 0.06 \text{\AA}^{-1}$ ), который, как показано выше, приписывается белковой составляющей нуклеосомной структуры, будет зависеть от активности клетки. Тогда представляется нетривиальным вопрос о том, каково соотношение между интегральным по ядру количеством „целых“ нуклеосом в составе хроматина ядра у клеток, которые могут нормально пролиферировать, и у аномально пролиферирующих злокачественно трансформированных клеток. На рис. 7 приведены кривые МУРН для ЯЭК, ЯЛК и ядер, выделенных из аномально пролиферирующих клеток человека HeLa и клеток линии A238 китайского хомячка. Кривые МУРН, приведенные на рисунке, для ядер из нормальных клеток и аномально пролиферирующих клеток имеют существенные различия в форме

линии. Как отмечалось выше, слабый пик на кривой рассеяния для ди- и тринуклеосомных частиц, а также и для хроматина в составе целого ядра наблюдается при величине рассеянного вектора  $Q \sim 0.06 \text{\AA}^{-1}$ . Именно в этой области величин  $Q$  наблюдаются различия в интенсивности рассеяния для нормальных ядер (ЯЭК и ЯЛК) и ядер злокачественно трансформированных клеток HeLa и A238. Интенсивность рассеяния хроматина ядер, выделенных из клеток HeLa, меньше в 3 раза, чем у хроматина ЯЭК и ЯЛК в области  $Q \sim 0.06 \text{\AA}^{-1}$ , а у хроматина ядер, выделенных из клеток линии A238, — в 5 раз. Выше нами было показано, что пик в области  $Q \sim 0.06 \text{\AA}^{-1}$  при рассеянии на хроматине целых ядер нормально пролиферирующих клеток по величине контраста обязан своим происхождением белковому коду нуклеосом. С другой стороны, интенсивность рассеяния в этой области пропорциональна среднему количеству нуклеосомных частиц в хроматине ядра. Учитывая эти обстоятельства, можно сделать предположение, что в хроматине ядер аномально пролиферирующих клеток среднее число нуклеосом с общепринятой структурой существенно меньше по сравнению с нормальными клетками, по крайней мере пропорционально уменьшению интенсивности рассеяния.

Изменения в форме кривых МУРН на хроматине ядер аномально пролиферирующих клеток приводят соответственно и к изменению функций  $P(r)$  (рис. 7) в сравнении с аналогичными функциями для хроматина целых ЯЭК и ЯЛК. Основное различие сводится к тому, что у функций распределения по расстояниям для хроматина ядер клеток HeLa отсутствуют признаки бимодальности.

#### 4. Обсуждение

Используя метод МУРН, авторы пытались ответить на два вопроса. Во-первых, можно ли в составе целого ядра при сложной иерархии упаковки хроматина наблюдать признаки нуклеосомной структуры. Во-вторых, если нуклеосомный тип упаковки хроматина в составе целого ядра наблюдаем, то как соотносятся параметры нуклеосомной упаковки хроматина у ядер различных клеток.

Одной из особенностей современного состояния знаний о структуре хроматина в ядре интерфазной клетки является разделение ее на иерархию структур, каждая из которых исследуется практически независимо друг от друга как в структурном, так и в функциональном аспекте.

В этой иерархии структур окончательно устоявшейся является лишь двойная спираль Уотсона-Крика ( $\sim 2$  nm). Нуклеосомный уровень организации хроматина ( $\sim 10$  nm) исследуется последние тридцать лет, в нем существуют устоявшиеся структурные и функциональные результаты, но структурная динамика нуклеосом и ее связь с более высокими порядками упаковки хроматина далеки от ясности. Относительно следующего уровня организации, фибрильного ( $\sim 30$  nm), до сих пор идет дискуссия о способах укладки в нем нуклеосом, и существуют экспериментальные результаты как в пользу соленоидального способа укладки нуклеосом в фибрильную структуру, так и в пользу укладки типа зигзаг. Еще менее изученным является уровень организации хроматина, в котором существуют петли (300 nm). Кроме того, есть еще масштаб хромосомный ( $\sim 1000$  nm) и масштаб ядра как целого ( $\sim 5000$  nm). К сожалению, как правило, нуклеосомный, фибрильный и петлевой уровни организации хроматина исследуются не в структуре ядра как целого, а путем их препаративной экстракции из общей структуры ядра. К несомненным достоинствам метода МУРН следует отнести возможность работать с биологическими объектами в водных средах, т.е. в условиях, близких к нативным.

Полученные в экспериментальной части результаты свидетельствуют о том, что и в интерфазных ЯЭК, и в ЯЛК, которые в принципе могут нормально пролиферировать, нуклеосомная структура проявляется в форме кривых МУРН, качественно близких к аналогичным кривым, полученными в работе [10] для гомогенных растворов ди- и тринуклеосомных частиц. Различие состоит в том, что пик, характерный для нуклеосомной структуры, находится в области  $Q \sim 0.06 \text{ \AA}^{-1}$  (что соответствует линейным размерам  $L = 2\pi/Q = 100 \text{ \AA}$ ), тогда как в [10] он находится в области  $Q \sim 0.04 \text{ \AA}^{-1}$ .

Функции распределения по расстояниям для ЯЭК и ЯЛК имеют форму бимодального распределения, которое характерно для нуклеосомной структуры [10]. В отличие от [10] пик, обусловленный своим происхождением межнуклеосомному распределению по расстояниям, имеет более высокую интенсивность, чем мода, характеризующая моноклеосомное распределение.

С учетом того, что в составе хроматина целого ядра, в моду межнуклеосомного распределения дают вклад все ближайшие пространственные соседи, окружающие данную нуклеосому, а не только два соседа в цепи ДНК, нами сделана оценка, которая дает 6–7 нуклеосом, окружающих каждую нуклеосому.

Таким образом, можно утверждать, что, несмотря на изложенные выше особенности метода МУРН и препаративных процедур, нуклеосомная структура в составе хроматина целых интерфазных ядер имеет в среднем по ядру гомогенные параметры структуры. Экспериментальные результаты, которые получены на ЯЭК и ЯЛК, важны и в методическом аспекте, так как они дают базу для относительных измерений, демонстрируя, что в двух различных типах нормальных ядер, приготовленных таким образом, чтобы по возможности сохранить структуру хроматина близкой к нативной структуре, можно регистрировать нуклеосомную структуру и определять ее интегральные по ядру параметры, используя метод МУРН.

Попытка влиять на нуклеосомную структуру в составе хроматина целого ядра путем введения интеркалирующего агента EtBr также дала результаты, которые согласуются с литературными данными. Функция распределения по расстояниям при этом для ЯЭК и ЯЛК становится мономодальной, и в ней падает интенсивность крыла, отвечающего за структуры более высокого порядка. Эти результаты совпадают с данными работы [16], в которой аналогичный результат при интеркаляции EtBr в ДНК ядер печени крыс получен методом дифференциальной сканирующей калориметрии. Одномодальность функции распределения и положение пика этого распределения соответствуют данным об удлинении линкерных участков и об изменении размеров белкового кора при нарушении ДНК-гистоновых взаимодействий в процессе интеркаляции EtBr в ДНК.

Драматические изменения в форме линий МУРН появляются при измерениях на нативных ядрах, выделенных из злокачественно трансформированных, аномально пролиферирующих клеточных линий человека HeLa и китайского хомячка A238. Область кривой МУРН, соответствующая нуклеосомной структуре, уменьшается по интенсивности в несколько раз, а функции распределения по расстояниям теряют признаки бимодальности. Эти результаты указывают на то, что в случае аномально пролиферирующих злокачественно трансформированных клеток хроматин в составе целого ядра имеет существенные возмущения в характере нуклеосомной организации в среднем по ядру.

Бликие результаты были получены в [17]. В этой работе с помощью модели гепатоцитов карциномы печени крыс методом дифференциальной сканирующей калориметрии на изолированных ядрах было показано, что в опухоли происходит изменение упаковки хроматина, связанное с потерей взаимодействия между кораи нуклеосомных частиц. В ядрах, выделенных из опухоли после 46 недель инициации, в термограмме практически

исчезает эндотермический пик при 107°C, что соответствует распаду коровых частиц, как предполагают авторы, в силу высокой транскрипционной активности резистентных узлов.

Если принять во внимание экспериментальный факт, полученный нами путем контрастирования, что основной вклад в интенсивность кривой рассеяния в области нуклеосомной структуры вносит белковый кор, то можно предположить, что, например, ввиду высокой транскрипционной активности аномально пролиферирующих клеток к существенной части ДНК (к большому числу генов) необходим доступ соответствующих белковых комплексов. В силу этих обстоятельств происходит диссоциация существенной части нуклеосом в среднем по ядру на димеры (Н2А-Н2В) и тетрамеры (Н3-Н4)<sub>2</sub>. Это в свою очередь приводит к тому, что интенсивность кривой МУРН в области нуклеосомной структуры падает, так как интенсивность рассеяния нейтронов в этой области рассеянных векторов (линейный размер рассеивателя порядка размеров целой нуклеосомы) обязана своим происхождением целому недиссоциированному гистоновому кору.

## Список литературы

- [1] A. Groth, W. Rocha, A. Verreault, G. Almouzni. *Cell* **128**, 721 (2007).
- [2] T. Kouzarides. *Cell* **128**, 693 (2007).
- [3] B. Li, M. Carey, J.L. Workman. *Cell* **128**, 707 (2007).
- [4] C.A. Davey, D.F. Sargent, K. Luger, A.W. Maeder, T.J. Richmond. *J. Mol. Biol.* **319**, 1097 (2002).
- [5] T. Schalch, S. Duda, D.F. Sargent, J. Richmond. *Nature* **436**, 138 (2005).
- [6] P.J.J. Robinson, L. Fairall, A.T. van Huynh, D. Rhodes. *PNAS* **103**, 6506 (2006).
- [7] J. Zlatanova, S.H. Leuba, K. van Holde. *Biophys. J.* **74**, 2554 (1998).
- [8] V.A. Huynh, P.J. Robinson, D. Rhodes. *J. Mol. Biol.* **345**, 5, 957 (2005).
- [9] D.J. Tremethick. *Cell* **128**, 651 (2007).
- [10] M. Hammermann, K. Toth, C. Rodemer, W. Waldeck, R.P. May, J. Langowski. *Biophys. J.* **79**, 584 (2000).
- [11] D.I. Svergun, M.H.J. Koch. *Rep. Prog. Phys.* **66**, 1735 (2003).
- [12] D.V. Lebedev, M.V. Filatov, A.L. Kuklin, A.Kh. Islamov, E. Kentzinger, R. Pantina, B.P. Toperverg, V.V. Isaev-Ivanov. *FEBS Lett.* **579**, 1465 (2005).
- [13] Y.M. Ostanevich. *J. Makromol. Chem. Macromol. Symp.* **15**, 91 (1988).
- [14] <http://www.embl-hamburg.de/ExternalInfo/Research.Sax/software.html>.
- [15] K. Luger. *Chromosome Res.* **14**, 5 (2006).
- [16] C. Balbi, M.L. Abemoschi, A. Zunino, C. Cuniberti, B. Cavazzas, P. Barboro, E. Patrone. *Biochem. Phorm.* **37**, 1815 (1988).
- [17] P. Barboro, A. Pasini, S. Parodi, C. Balbi, B. Cavazza, C. Allera, G. Lazzarini, E. Patrone. *Biophys. J.* **65**, 1690 (1993).