



УДК 576.312:577.156

БЕЛКОВЫЙ СОСТАВ И ОРГАНИЗАЦИЯ ЯДЕРНОГО МАТРИКСА

И. Б. Збарский

В клеточном ядре содержится два типа белков. С одной стороны, это гистоны — белки основного характера, ограниченные пятью видами и несколькими их модификациями. С другой — негистоновые или кислые белки, представленные множеством индивидуальных белков (несколько сотен). Локализация гистонов практически ограничена хроматином, тогда как негистоновые белки встречаются во всех субструктурах ядра: хроматине, ядерном соке, ядрышках, ядерной оболочке, ядерном скелете.

Лишь некоторые из негистоновых белков выделены в гомогенном состоянии и охарактеризованы. К ним относятся, например, белки высокоподвижной группы хроматина и убиквитин.

Экстракцией изолированных ядер физиологическим раствором соли и 1—2 М NaCl извлекается глобулиновая фракция, соответствующая ядерному соку, и дезоксирибонуклеопротеид хроматина, после чего остается нерастворимая фракция, содержащая остатки ядрышек и ядерной оболочки и внутриядерную рибонуклеопротеидную сеть и образующая ядерный скелет [1, 2]. Экстракцией разведенной щелочью этот остаток может быть разделен на растворимую в щелочи фракцию кислого белка и щелоченерастворимую фракцию остаточного белка, содержащую остатки ядерной оболочки и внутриядерную сеть и представляющую собой, по-видимому, истинный остов клеточного ядра [1—3].

Щадящей экстракцией 2 М NaCl можно получить препарат ядерного скелета или ядерного матрикса, к которому в виде петель прикреплены практически вся ядерная ДНК, так называемые «нуклеоиды» [4]. Таким образом, ядерный матрикс обеспечивает высшие порядки организации хроматина. В точках прикрепления ДНК локализован репликативный комплекс, в них же инициируется транскрипция [5, 6]. В ассоциации с ядерным матриксом расположены активные гены [7].

Ядерный матрикс представляет собой в основном белковую структуру и содержит лишь небольшие количества ДНК, РНК, фосфолипидов и углеводов. В попытках выяснить, какие белки непосредственно связаны с ДНК, препараты ядерного матрикса и остова митотических хромосом обрабатывались детергентом, 2 М NaCl, саркозилем или гуанидин хлоридом и центрифугировались в градиенте цезия. После удаления основной массы белков с ДНК оставались связанными белки с молекулярной массой около 55000, 30000 и 18000, причем белок 18000 оказался связанным также и с отщепленной ДНК [8].

Препараты ядерного матрикса выделены из целого ряда клеток, включая печень и другие органы млекопитающих, опухоли, растения, простейшие и др. [5, 9]. Морфологически они состоят из немембранных структур ядерной оболочки — фиброзного слоя (или ламины) и поровых комплексов, остаточных ядрышек и внутриядерной фибриллярно-гранулярной сети (рис. 1, см. вклейку).

Белковый состав ядерного матрикса из разных клеток довольно близок. На одномерной электрофореграмме обычно различают около 30 белковых полос, причем характерными являются полосы в области молекулярной массы 60000—70000, происходящие в основном из фиброзного слоя ядерной оболочки, вследствие чего их часто называют ламинами. Белковый профиль матрикса ядра существенно отличается от профиля других ядерных структур, как это видно на примере печени крысы (рис. 2, см. вклейку). Эта электрофоретическая картина

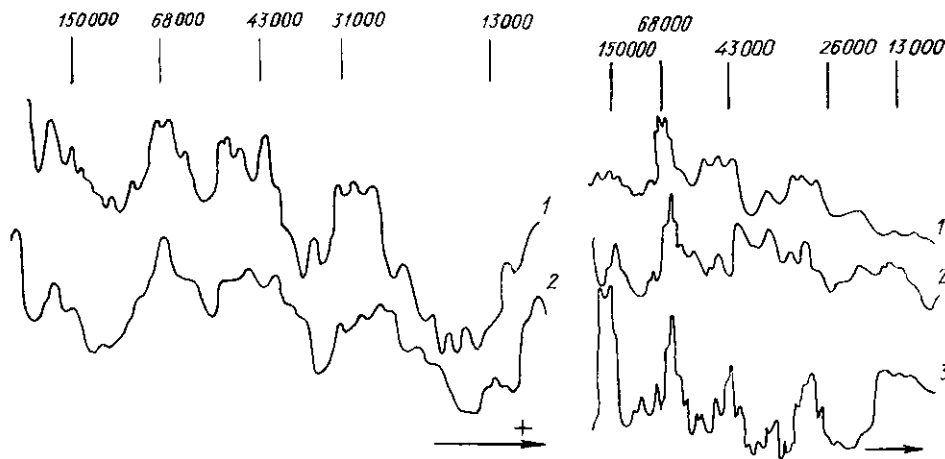


Рис. 3. Денситограммы электрофоретического профиля белков ядерного матрикса: 1 — нормальной печени; 2 — регенерирующей печени крысы. На этом рис. и на рис. 4, 5, 7, 10, 11 цифровые обозначения — стандарты молекулярной массы [11].

Fig. 3. Electrophoretic profile of nuclear matrix proteins: normal liver (1), regenerating liver of the rat (2). Here and in Figs. 4, 5, 7, 10, 11 upper figures — molecular weight standards [11].

Рис. 4. Денситограммы электрофоретического профиля белков ядерного матрикса: 1 — нормальной печени; 2 — асцитной гепатомы Зайделя; 3 — солидной гепатомы 27 крысы [11].

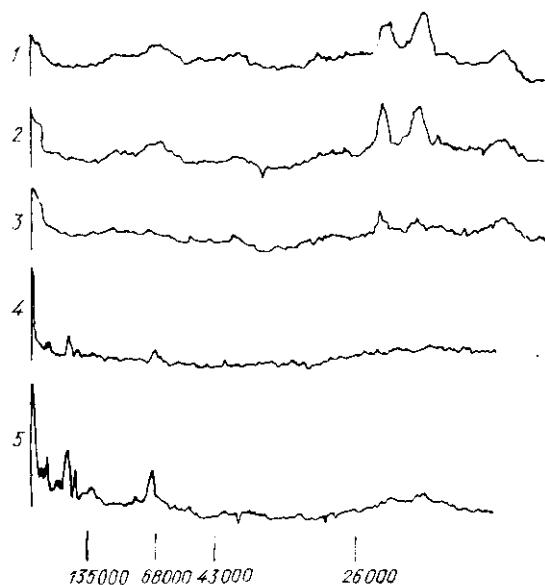
Fig. 4. Electrophoretic profile of nuclear matrix proteins: normal liver (1), Zajdel ascites hepatoma (2), solid hepatoma 27 of the rat (3) [11].

мало меняется в процессе митоза [10] и почти идентична таковой остова (или «скаффолда») митотических хромосом [8]. С другой стороны, в быстро пролиферирующих тканях, например в регенерирующей печени (рис. 3), можно отметить некоторые отличия, выражающиеся в преобладании средней полосы «триплета» в области 60000—70000 ламина В, и в относительном уменьшении пиков в области около 30000 (рис. 3) [11]. Более значительные различия отмечаются в препаратах ядерного матрикса из опухолей. Наряду с особенностями, наблюдаемыми в случае пролиферирующих тканей, здесь выявляется обилие белков в высокомолекулярной (свыше 100000) и сравнительно низкомолекулярной (менее 20000) областях (рис. 4). Эти отличия относительно невелики в препаратах из асцитной гепатомы Зайделя, но резко выражены в ядерном матриксе из солидной гепатомы 27.

Особенности опухолей еще более выражены в препаратах щелоченерастворимого остаточного белка. Белковый профиль остаточного белка трех нормальных органов крысы — печени, почек и селезенки довольно близок, но резко отличается от профиля остаточного белка двух сарком (рис. 5). Это различие еще более наглядно при сопоставлении распределения белков по молекулярной массе: в нормальных органах белки с молекулярной массой свыше 100000 не превышают 30 %, а в саркомах их доля доходит до 66 % (таблица) [12].

При исследовании поверхности ядерного матрикса методом сканирующей электронной микроскопии можно различить ячейки или гранулы диаметром 25—30 нм, составляющие почти всю поверхность

препарата (рис. 6, см. вклейку). Эти гранулы удается выделить из препаратов ядерного матрикса, а также политенных хромосом и ядерной оболочки клеток слюнной железы хирономуса. Они получены также и из особого вида ядерного матрикса — кариосферы ооцитов лягушки [13]. Изоляция таких гранул осуществляется путем обработки препарата разведенной щелочью или гиалуронидазой. Эти агенты, по-видимому, разрушают связь между гранулами, которую могут обеспечивать гликозаминогликаны. Так как гранулы выделяются в значитель-



ном количестве, можно думать, что они составляют основу структуры ядерного матрикса. Форма этих гранул не сферическая, скорее они уплощены и имеют утолщения на периферии. Предполагается, что они состоят из более мелких субчастиц. Если при изоляции

Рис. 5. Денситограммы электрофоретического профиля остаточного белка: 1 — печень; 2 — почки; 3 — селезенка; 4 — саркома Йенсена; 5 — саркома Иосиды [12].

Fig. 5. Electrophoretic profile of the residual protein fraction: liver (1), kidney (2), spleen (3), Jensen sarcoma (4), Yoshida sarcoma (5) [12].

гранул опустить обработку ДНКазой, то гранулы остаются ассоциированными с нитями ДНК, т. е. они, вероятно, содержат субстрат прикрепления ДНК к матриксу, обеспечивающий высшие порядки структурной организации хроматина. Действительно, электрофорез белков названных гранул выявляет белковые полосы, соответствующие полученным при изучении белков ядерного матрикса, наиболее прочно соединенных с ДНК [8, 13]. Особенно характерны полосы в области около 55000 и 30000 (рис. 7, см. вклейку). Гранулы хорошо видны при напылении платиной — углеродом. Нередко они образуют агрегаты, напоминающие периферические гранулы поровых комплексов и соответствующие им по размеру и общему виду (рис. 8, см. вклейку). Соотношение этих гранул с другими структурами, наблюдаемыми в ядерном матриксе, например волокнами диаметром около 5 нм [14], неясно, однако возможно, что составляющие их белки претерпевают конформационные изменения, приводящие к переходу фибриллярных и гранулярных структур друг в друга.

Соотношение фракций остаточного белка ядер нормальных органов и сарком крыс, % [12]

Ratio of Residual Protein Fractions from Normal Organs and Rat Sarcomas, %

Объект исследования	Молекулярная масса фракций		
	>100000	100000—40000	< 26000
Печень	14	33	53
Почки	14	25	61
Селезенка	30	21	49
Саркома Йенсена	66	13	21
Саркома Иосиды	66	16	18

Ядерный матрикс ассоциирован не только с ДНК, но и с РНК [5, 15, 16]. Для идентификации белков ядерного матрикса, непосредственно связанных с РНК, было применено облучение клеток ультрафиолетовыми лучами, вызывающими сшивание РНК — белок, выделение затем комплексов с помощью олиго-(dT)-целлюлозной хроматографии или гибридизации с определенного типа ДНК и обработки нуклеазами. Оказалось, что как клеточная, так и вирусная мРНК прикреплены к белкам с молекулярной массой 41500 и 43000, тогда как белки 38000 и 39000 образуют сердцевину РНП-частиц и не участвуют в ассоциации с матриксом [17].

Помимо вышеназванных белков наиболее хорошо охарактеризованы ламинны — белки фиброзного слоя ядерной оболочки. Показано, что ламинны А и С близки иммунологически [18] и по аминокислотной последовательности [19], тогда как ламин В отличается от них. Ламинны А и С, по-видимому, являются компонентами собственно ламинны, тогда как ламин В, а также белок с молекулярной массой 150000—190000 представляют собой компоненты комплексов ядерных пор [20]. В последнее время получены доказательства того, что высокомолекулярный белок является полимером ламинны В и содержит углеводные компоненты [21].

Для характеристики локализации белков фракции ядерного матрикса, обогащенной поровыми комплексами [22, 23], были получены антитела к высокомолекулярным белкам (150000—160000) этой фракции и проведено исследование их локализации в разных клетках методом непрямой иммунофлюоресценции [24]. Оказалось, что эти белки не обладают ни видовой, ни органной специфичностью. Особенно четкие результаты с антителами к белкам печени крысы получались с фибробластами эмбриона человека в культуре. В интерфазных клетках антиген выявлялся только в ядре, причем флюоресценция четко локализовалась по периферии ядра. Напротив, в митозе антиген был обнаружен по всей клетке, а метафазные хромосомы выглядели даже несколько темнее цитоплазмы (рис. 9, см. вклейку).

Вопрос о соотношении периферического слоя (ламинны) и внутриядерного матрикса, а также остова («скаффолда») хромосом между собой остается неясным. Несмотря на сходство электрофоретического профиля фиброзный слой можно отделить от внутриядерного матрикса обработкой дитиотреитолом и, следовательно, значительная часть внутриядерного матрикса образуется путем агрегации белков через дисульфидные связи [25, 26]. Белки внутриядерного матрикса, имеющие одинаковую молекулярную массу с ламиннами, оказались отличными от них как иммунологически, так и при разделении двухмерным электрофорезом [27].

Ядерный матрикс представляет собой весьма динамичную белковую структуру. При обычных способах изоляции протеолиз ее, по-видимому, невелик, однако при продолжительной инкубации он может быть значительным и, вероятно, зависит от ионной силы и характера ионов среды. Интересно, что в первую очередь протеолитическому распаду подвергаются ламинны. Эти же белки легко образуют фосфорилированный продукт, отличающийся растворимостью и, по всей видимости, переходящий в растворимую фазу при митозе [28].

Мало исследован биосинтез белков ядерного матрикса. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что он происходит более активно, чем биосинтез общих белков ядра или клетки в целом [29, 30]. Разные белки ядерного матрикса синтезируются с неодинаковой скоростью. Так, при инкубации асцитных клеток гепатомы Зайделя с меченым гидролизатом белков хлореллы наиболее активное включение метки наблюдалось в высокомолекулярную фракцию белков и отчасти в относительно низкомолекулярные пептиды (рис. 10), отличающиеся наиболее высокой скоростью обмена, поскольку в короткие сроки инкубации метка включается в них особенно активно, а в высокомолекулярной фракции чаще выявляется в более продолжительные сроки [30].

Многими авторами неоднократно отмечалось, что биосинтез ядерных белков в отличие от цитоплазматического синтеза подавляется хлорамфениколом [31]. Эта особенность четко проявляется в асцитной гепатоме Зайделя, где происходит некоторое подавление включения меченых аминокислот и в тотальные белки клетки [32]. Интересно, что в ядерном матриксе асцитных опухолевых клеток дифференцированно подавляется включение меченых аминокислот именно в наиболее быстро синтезирующиеся белки с высокой и низкой молекулярной

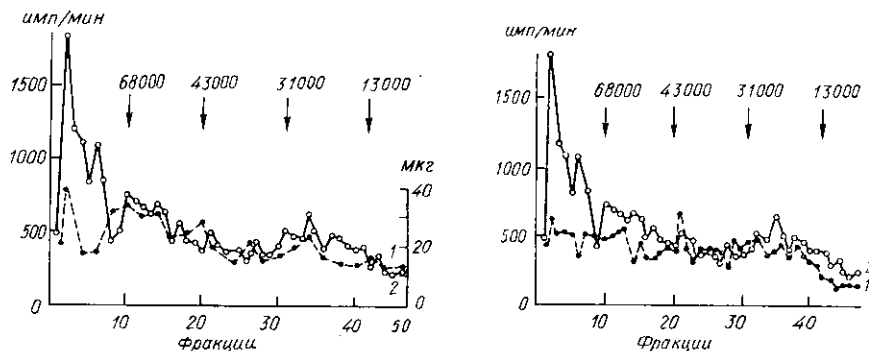


Рис. 10. Содержание белка и включение меченого гидролизата белка хлореллы во фракции ядерного матрикса гепатомы Зайделя, разделенного электрофорезом: 1 — белок (правая ордината); 2 — радиоактивность (левая ордината) [30].

Fig. 10. Protein content and radioactivity incorporation of labelled *Chlorella* protein hydrolysate into protein fractions of Zajdel hepatoma nuclear matrix separated by electrophoresis: protein (1) (right ordinate), radioactivity (2) (left ordinate) [30].

Рис. 11. Включение радиоактивной метки в белки ядерного матрикса асцитной гепатомы Зайделя при инкубации клеток в течение 30 мин: 1 — при добавлении 200 мкг/мл хлорамфеникола; 2 — без добавления хлорамфеникола.

Fig. 11. Radioactivity incorporation into nuclear matrix proteins of Zajdel ascites hepatoma cells during 30 min incubation: with 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ chloramphenicol (1), without chloramphenicol (2).

массой (рис. 11). Эти данные говорят о возможности особых, еще не изученных путей биосинтеза белков ядерного матрикса.

Скелетная структура ядра выполняет важные регуляторные функции, участвуя в репликации ДНК, транскрипции и внутриядерном транспорте РНК. Хотя это в основном белковая структура, лишь некоторые белки ее частично охарактеризованы. К ним относятся ламины, некоторые белки поровых комплексов, белки, ассоциированные с ДНК и РНК. Ядерный матрикс представляет собой динамичную структуру. В клеточном цикле в нем постоянно происходят процессы протеолиза и протеосинтеза, фосфорилирования, образования дисульфидных связей и, вероятно, конформационные переходы. Пока мы знаем еще очень немного о ядерном матриксе, и дальнейшее его изучение может оказаться весьма важным для выяснения ряда кардинальных процессов в клетке.

PROTEIN COMPOSITION AND ORGANIZATION OF THE NUCLEAR MATRIX

I. B. Zbarsky

N. K. Koltsov Institute of Developmental Biology,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Summary

In proliferating cells the nuclear matrix differs in higher content of lamin B and lower content of polypeptides in the region of about 30 kilodaltons. In hepatomas and other tumours in addition to these features the content of high molecular weight (higher than 100 kilodalton) polypeptides is considerably elevated in the nuclear matrix as well as in

the residual protein fraction. Granules, 25-30 nm in diameter, similar to annular granules of the pore complexes are observed in the nuclear matrix. These granules may be isolated after treatment with dilute alkali or hyaluronidase. High molecular weight polypeptides of the alkali-insoluble fraction of the nuclear matrix, as well as lamins, are revealed by immunofluorescence at the periphery of the interphase nucleus, however, during mitosis they are spread all over the cell. The proteins of the nuclear matrix intensely incorporate the labelled precursors, the incorporation into the most high molecular weight and into the most lower molecular weight polypeptides being inhibited by chloramphenicol.

1. Збарский И. Б. О составе и биосинтетической активности ядерных структур.— В кн.: Тр. 5-го Междунар. биохим. конгр. Симпоз. II. М.: Наука, 1962, с. 126—136.
2. Збарский И. Б., Георгиев Г. П. Новые данные по фракционированию клеточных ядер печени крысы и химическому составу ядерных структур.— Биохимия, 1959, 24, № 2, с. 192—199.
3. Георгиев Г. П., Ермолаева Л. П., Збарский И. Б. Количественное соотношение белковых и нуклеопротеидных фракций в клеточных ядрах различных тканей.— Биохимия, 1960, 25, № 2, с. 318—322.
4. Cook P. R., Brazell J. A. Supercoils in human DNA.— J. Cell Sci., 1975, 19, p. 261—269.
5. Berezney R. Dynamic properties of the nuclear matrix.— In: The Cell Nucleus / Ed. H. Busch. New York: Acad. press, 1979, v. 7, p. 413—456.
6. Miller T. E., Huang C. Y., Pogo A. O. Rat liver nuclear skeleton and ribonucleoprotein complexes containing hnRNA.— J. Cell Biol., 1978, 76, N 3, p. 675—691.
7. Small D., Nelkin B., Vogelstein B. Nonrandom distribution of replicated DNA sequences with respect to supercoiled loops and the nuclear matrix.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, 79, N 19, p. 5911—5915.
8. The proteins tightly bound to DNA in the regions of DNA attachment to the skeletal structures of interphase nuclei and metaphase chromosomes / S. V. Razin, A. V. Roodin, V. V. Chernokhvostov.— Cell, 1981, 27, N 1, p. 65—73.
9. Zbarsky I. B. Nuclear skeleton structures in some normal and tumor cells.— Mol. Biol. Reps, 1981, 7, N 3, p. 139—148.
10. Nuclear matrix of HeLa S₃ cells. Polypeptide composition during adenovirus infection and in phases of the cell cycle / L. D. Hodge, P. Mancini, F. M. Davis, P. Heywood.— J. Cell Biol., 1977, 72, N 1, p. 194—208.
11. Особенности белкового состава ядерного матрикса в некоторых опухолях и культуре фибробластов китайского хомячка / С. Н. Кузьмина, Т. В. Бульдяева, С. И. Поликарпова, И. Б. Збарский.— Биохимия, 1983, 48, № 5, с. 844—850.
12. Белковый состав и электронная микроскопия фракции остаточного белка клеточных ядер некоторых нормальных органов и опухолей крыс / И. Б. Збарский, К. А. Перевощикова, Л. С. Филатова, В. С. Попова.— Вopr. мед. химии, 1980, 26, № 3, с. 406—410.
13. Granules 25—30 nm in diameter — a basic constituent of the nuclear matrix, chromosome scaffold and nuclear envelope / P. Engelhardt, U. Plagens, I. B. Zbarsky, L. S. Filatova.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, N 22, p. 6937—6940.
14. Berezney R. Fractionation of the nuclear matrix. I. Partial separation into matrix protein fibrils and a residual ribonucleoprotein fraction.— J. Cell Biol., 1980, 85, N 3, p. 641—650.
15. The relationship of the nuclear matrix to cellular structure and function / J. H. Shaper, D. M. Pardoll, Kaufmann S. H. et al.— Adv. Enzyme Regul., 1979, 17, p. 213—248.
16. Faiferman I., Pogo A. O. Isolation of nuclear ribonucleoprotein network that contains heterogeneous RNA and is bound to the nuclear envelope.— Biochemistry, 1975, 14, N 17, p. 3808—3816.
17. In vivo cross-linking of proteins to mRNA in human cells / W. J. Van Venrooij, A. J. M. Wagenmakers, P. Oetelaar, R. J. Reinders.— Mol. Biol. Reps, 1981, 7, N 3, p. 93—99.
18. Gerace L., Blum A., Blobel G. Immunochemical localization of the major polypeptides of the nuclear pore complex-lamina fraction.— J. Cell Biol., 1978, 79, N 2, p. 546—566.
19. Shelton K. R., Guthrie V. H., Cochran D. L. On the variation of the major nuclear envelope (lamina) polypeptides.— Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1980, 93, N 3, p. 867—872.
20. Krohne G., Franke W. W., Scheer U. The major polypeptides of the nuclear pore complex.— Exp. Cell Res., 1978, 116, N 1, p. 85—102.
21. Gerace L., Ottaviano Y., Kondor-Koch C. Identification of a major polypeptide of the nuclear pore complex.— J. Cell Biol., 1982, 95, N 3, p. 826—837.
22. Фракционирование ядерного матрикса печени крысы / С. Н. Кузьмина, Т. В. Бульдяева, Л. П. Троицкая, И. Б. Збарский.— Докл. АН СССР, 1980, 250, № 5, с. 1470—1473.
23. Электронно-микроскопическая характеристика ядерного матрикса и его фракций / Л. П. Троицкая, С. Н. Кузьмина, Т. В. Бульдяева, И. Б. Збарский.— Цитология, 1981, 23, № 6, с. 620—625.
24. Иммунологическая локализация высокомолекулярных щелоченерастворимых полипептидов ядерного матрикса печени крысы / И. Б. Збарский, И. Виртанен, В.-П. Лехто и др.— Цитология, 1982, 24, № 12, с. 1424—1429.

25. Kaufmann S. H., Coffey D. S., Shaper J. H. Considerations on the isolation of rat liver nuclear matrix, nuclear envelope and pore complex-lamina.—*Exp. Cell Res.*, 1981, **132**, N 1, p. 105—123.
26. Вокуркова Н., Збарский И. Б. Особенности электрофоретической картины белков ядерного матрикса гепатомы 27 крыс и действие на нее некоторых ингибиторов протеиназ.—*Вопр. мед. химии*, 1982, **28**, № 6, с. 113—117.
27. Fields A. P., Kaufmann S. H., Shaper J. H. Isolation, chemical characterization and immuno-localization of an acidic non-histone protein to the nucleus of rat liver nuclei.—In: 8-th Nucle(ol)ar Workshop (Banyuls, 23—30 Juin 1983). Banyuls, 1983, p. 30.
28. Gerace L., Blobel G. The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis.—*Cell*, 1980, **19**, N 1, p. 277—287.
29. Hemminki K. Labelling of histones and non-histones in lung nuclear matrix and chromatin fractions.—*Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, 1977, **358**, N 9, S. 1125—1131.
30. Кузьмина С. Н., Бульдяева Т. В., Збарский И. Б. Белки ядерного матрикса и их биосинтез в клетках печени крысы и гепатомы Зайделя.—*Биохимия*, 1980, **45**, № 8, с. 1417—1424.
31. Kuehl L. Nuclear protein synthesis.—In: *The Cell Nucleus* / Ed. H. Busch. New York : Acad. press, 1974, v. 3, p. 345—375.
32. Избирательное подавление хлорамфениколом биосинтеза белков в клетках асцитных опухолей. / Т. В. Бульдяева и др.—*Эксперим. онкология*, 1984, **6**, № 4, с. 35—38.

Ин-т биология развития
им. Н. К. Кольцова АН СССР, Москва

Получено 03.09.84

УДК 577.152.5

ДНК-ТОПОИЗОМЕРАЗЫ ПРОЛИФЕРИРУЮЩИХ ЖИВОТНЫХ КЛЕТОК

В. В. Терских, И. Б. Бронштейн,
И. И. Громова, А. В. Тимофеев, К. А. Кафиани

Введение. ДНК-топоизомеразы представляют собой своеобразную группу генетических ферментов, которые катализируют переходы между различными конформационными или топологическими формами ДНК. Основные реакции, катализируемые топоизомеразами: суперспирализация или релаксация кольцевых двухцепочечных молекул ДНК, катенация и декатенация (зацепление и разъединение) одно- и двухцепочечных колец ДНК, завязывание и развязывание узлов в кольцевых молекулах ДНК, соединение двух одноцепочечных колец с комплементарной последовательностью в полностью дуплексную кольцевую молекулу [1—3]. Топоизомеразы также способны осуществлять инсерцию и эксцизию вирусных ДНК и соединение цепей ДНК с образованием новых последовательностей. Благодаря наличию таких активностей ДНК-топоизомеразы могут играть весьма важную роль в таких основных генетических процессах, как репликация, рекомбинация, репарация и транскрипция, а также в структурных перестройках ДНК в составе хроматина.

Большинство реакций, осуществляемых топоизомеразами, связано с переносом сегментов цепей ДНК с одной стороны замкнутой структуры на другую, что требует внесения временных одноцепочечных (в случае топоизомераз I типа) или двухцепочечных (в случае топоизомераз II типа) разрывов фосфодиэфирной связи в ДНК, которая затем замыкается ферментом. Энергия, нужная для восстановления фосфодиэфирной связи, сохраняется в промежуточном ковалентном фермент-субстратном комплексе, обычно в фосфотирозинового связи между молекулой фермента и одним из возникших концов цепи в месте ее разрыва [4]. Собственно конформационные изменения ДНК могут не требовать макроэргических кофакторов, а происходить за счет свободной энергии суперспирализации (в случае топоизомераз I типа), но могут и нуждаться в АТФ (топоизомеразы II типа).

Функции топоизомераз в животных клетках практически не изучены. Для выяснения этих функций необходимо использование клеточ-