

УДК 591.3:576.315.42

## КОМПАКТИЗАЦИЯ ДНК В СПЕРМАТОГЕНЕЗЕ ЧЕЛОВЕКА. I. ДИНАМИКА КОМПАКТИЗАЦИИ НУКЛЕОГИСТОННОГО И НУКЛЕОПРОТАМИННОГО ХРОМАТИНА В ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩИХСЯ СПЕРМАТИДАХ

© 2012 г. Е. А. Арифудин<sup>1</sup>, Е. Е. Брагина<sup>2</sup>, В. А. Замятнина<sup>2</sup>, Е. Г. Волкова<sup>1</sup>, Е. В. Шеваль<sup>2</sup>,  
С. А. Гольшев<sup>2</sup>, Л. Н. Кинцурашвили<sup>2</sup>, Г. И. Кирьянов<sup>2</sup>, А. Н. Прусов<sup>2</sup>, В. Ю. Поляков<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова

119991 Москва, Воробьевы горы, д. 1, стр. 73

<sup>2</sup> НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, МГУ

119991 Москва, Воробьевы горы, д. 1, стр. 40

E-mail: sergei.golyshev@mail.genebee.msu.ru

Поступила в редакцию 04.05.10 г.

Окончательный вариант получен 20.01.11 г.

В работе изучена динамика изменений структуры хроматина на различных стадиях дифференцировки сперматид человека. Показано, что в ядрах ранних сперматид хроматин полностью декомпактизован, его структурной единицей является фибрилла толщиной около 8 нм. На начальных стадиях дифференцировки эта “элементарная” фибрилла является преобладающей структурой в ядрах, а на последующих этапах она постепенно замещается крупными глобулярными комплексами диаметром около 60 нм. В дальнейшем глобулы ассоциируют в фибриллярные структуры, толщина которых уменьшается до 30–40 нм. На всех стадиях дифференцировки, кроме конечных, глобулярно-фибриллярные комплексы представляют собой центры ассоциации элементарных фибрилл. Процесс конденсации хроматина имеет векторный характер – он направлен от апикальной зоны ядра к базальной. В зрелых сперматиде преобладающим компонентом являются фибриллы толщиной около 40 нм, тонкие фибриллы практически отсутствуют. По своей структурной организации ядра зрелых сперматид полностью соответствуют ядрам сперматозоидов с “незрелым” хроматином, которые в небольшом количестве обнаруживаются в эякуляте здоровых доноров и могут преобладать над нормальными клетками при патологиях спермиогенеза. Причина такой остановки дифференцировки остается непонятной. Возможно, в части сперматид блокируется формирование межмолекулярных дисульфидных связей, которые необходимы для завершающей фазы компактизации генома. Полученные результаты обсуждаются в связи с известными моделями организации нуклеопротаминового хроматина в сперматозоидах человека.

*Ключевые слова:* хроматин, ДНК, спермиогенез, сперматиды, гистоны, протамины, надмолекулярная организация.

Используемые сокращения: ДНП – дезоксирибонуклеопротеид, PBS – Phosphate Buffered Saline (солевой раствор с фосфатной буферной системой по Дюльбекко), TUNEL – Terminal dUTP Nick End Labelling (мечение разрывов концевым присоединением dUTP), DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole (4',6-диамидино-2-фенилиндола).

### ВВЕДЕНИЕ

Известно, что геном эукариот имеет сложную иерархическую организацию, которая обеспечивается специфическим взаимодействием ДНК с различными классами белков.

В соматических клетках “низший” уровень компактизации создается за счет взаимодействия

ДНК с тетрамером гистонов (H2A, H2B, H3 и H4), в результате формируются “элементарные” ДНП фибриллы, состоящие из дискретных нуклеопротеиновых частиц – нуклеосом (Richmond, Davey, 2003). Другой представитель гистонов – белок H1 – компактизует “элементарные” нуклеосомные фибриллы в ДНП-фибриллы толщиной около 30 нм (Thoma et al., 1979; Van Holde, 1988). В ряде работ описаны более высокие уровни организации хроматина соматических клеток эукариот (Ченцов, Поляков, 1969; Belmont, Bruce, 1994 Sheval et al., 2002; Ченцов, Бураков, 2005), однако молекулярные механизмы, обеспечивающие их формирование, остаются малоизученными.

В процессе формирования мужских гамет у многих представителей эукариот каноническая

нуклеогистонозная организация хроматина соматических клеток практически полностью переорганизуется (ремоделируется) на молекулярном и структурном уровне.

Ремоделирование хроматина – многоступенчатый процесс, который инициируется на ранних стадиях дифференцировки сперматид и завершается после прохождения сперматозоидов через эпидидимис (Oliva, 2006). На начальных этапах дифференцировки соматический тип гистонов или их тестис-специфических вариантов замещается транзиторными белками (TP1 и TP2), которые затем заменяются протаминами (Maistrich et al., 2002). В геноме человека в эквивалентных количествах экспрессируется два протамины – P1 и P2. Протамины представляют собой основные и строго специфические для спермиогенеза белки, они имеют домены, богатые аргинином и цистеином. Высокий уровень аргинина создает положительный заряд молекул белков, что обеспечивает эффективное связывание протаминов с ДНК. Остатки цистеина участвуют в формировании многочисленных внутренних и внешних дисульфидных связей, необходимых для компактной упаковки ДНК в хроматине сперматозоидов (Carell et al., 2007).

В настоящее время в области изучения ремоделирования хроматина достигнут существенный прогресс, однако представления о макромолекулярной организации нуклеопротаминовых комплексов в хроматине сперматозоидов остаются во многом гипотетическими. По одной из гипотез фундаментальными структурными единицами нуклеопротаминового хроматина являются тороиды – кольцевые структуры толщиной около 20 нм, с внешним диаметром около 90–100 нм и внутренним диаметром около 15 нм (Hud et al., 1993). Основу тороидов составляют петлевые домены ДНК (средний размер около 46 kb), линкеры между индивидуальными тороидами ассоциированы с белками ядерного матрикса (Ward, Ward, 2004). Главный недостаток этой модели состоит в том, что формирование тороидальных структур наиболее убедительно продемонстрировано в системе *in vitro* (Allen et al., 1996). Существование тороидов в “нативном” или искусственно декомпактизованном хроматине сперматозоидов не документировано. Кроме того, в некоторых работах показано, что нуклеопротаминовый хроматин имеет не тороидальную, а, скорее, иерархическую фибриллярно-глобулярную организацию (табл. 1). Имеются также данные о наличии в хроматине сперматозоидов крупных ДНК-содержащих сферических комплексов диаметром около 300 и 500 нм (табл. 1).

Отсутствие хорошо обоснованной и общепринятой модели структурной организации нуклеопротаминовых комплексов означает, что многочисленные данные по анализу молекулярных преобразований генома в условиях его ремодели-

рования трудно сопоставимы с представлениями о структурной реорганизации хроматина, сопровождающими этот процесс. Исследования в этой области представляют большой интерес не только в теоретическом плане. Показано, что нарушения в компактизации хроматина в сперматозоидах человека могут приводить к существенным нарушениям в нормальном развитии беременности, вплоть до ее преждевременного прерывания (Bragina и др., 2009).

Цель настоящей работы – изучение уровней организации нуклеопротаминового хроматина в сперматозоидах человека. Для электронно-микроскопического и иммуноцитохимического анализа использовали сперму здоровых доноров и инфертильных пациентов, в эякуляте которых обнаруживаются нормальные сперматозоиды и сперматиды, находящиеся на различных стадиях дифференцировки.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

### Тестирование жизнеспособности сперматозоидов

Суспензии сперматозоидов здоровых доноров и инфертильных пациентов (предоставлены для исследования клиникой “Альтравита”, г. Москва) инкубировали по стандартной методике 15 мин при 37°C. Каплю суспензии помещали на предметное стекло, смешивали с водным раствором эозина (1%) и определяли долю клеток, окрашенных эозином (мертвые клетки).

### Детектирование разрывов ДНК в хроматине сперматозоидов

Высушенные мазки очищенной спермы хранили при –20°C. Перед экспериментом мазки фиксировали 15 минут при комнатной температуре 4%-ным раствором формальдегида на PBS. Промывали образцы в двух сменах PBS по 5 минут каждая. Пермеабиллизировали клетки 0.2% р-ром Triton X-100 на PBS 5 минут при комнатной температуре. Обработывали образцы раствором протеиназы К (20 мкг/мл) на PBS 10 минут при комнатной температуре. После обработки протеиназой К образцы промывали в PBS 5 минут при комнатной температуре. Дополнительно фиксировали клетки формальдегидом. Для выявления разрывов ДНК использовали набор DeadEnd Fluorimetric TUNEL system (Promega), согласно инструкции производителя. После завершения ферментативной реакции образцы докрашивали DAPI (1 мкг/мл) на PBS 10 минут, отмывали излишки флуорохрома 10 минут в PBS при комнатной температуре, заключали образцы в MOVIO (Calbiochem) и изучали на флуоресцентном микроскопе с использованием объектива 100× NA 1.3.

Данные о структуре хроматина сперматозоидов по данным литературы

Автор	Структуры хроматина	Метод исследования	Модельный объект
Wagner, Yun, 1979	Глобулярные структуры диаметром около 40 и 15 нм	Искусственная деконденсация, электронная микроскопия	человек
Sobhon et al., 1981	Палочковидные структуры толщиной 45–100 нм и соединяющие их фибриллы, толщиной около 25–29 нм	Деконденсация мочевиной и дитиотрейтолом и микрококковой нуклеазой	крыса
Sobhon et al., 1982	Глобулярные фибриллы толщиной 90–120 и 38–52 нм, фибриллы толщиной 18–21 и 12–15 нм	Деконденсация саркозиллом и дитиотрейтолом, трансмиссионная электронная микроскопия	человек
Sobhon et al., 1982	Глобулярные фибриллы толщиной 33–42 и 65–120 нм и соединяющие их фибриллы толщиной 6–8 нм	Деконденсация микрококковой нуклеазой и 2 М NaCl, трансмиссионная и сканирующая электронная микроскопия	человек
Allen et al., 1993	Глобулярные структуры диаметром 50 и 100 нм	Искусственная деконденсация, атомный силовой микроскоп	бык, мышь, крыса
Hud et al., 1993	Тороид, внешний диаметр 90 нм, внутренний – 15 нм, толщина 20 нм	Деконденсация дитиотрейтолом, атомный силовой микроскоп, трансмиссионный электронный микроскоп	бык
Haaf, Ward, 1995	Глобулярные структуры диаметром около 300 нм	Спридинг ДНК, световая микроскопия, окраска DAPI	человек
Mudrak et al., 2006	Хромосома толщиной 1000 нм, состоящая из глобул 500 нм	Гибридизация ДНК, световая микроскопия	человек
Worawittayawong et al., 2008	Ранние сперматиды – фибриллы толщиной 10–30 нм, на последующих этапах дифференцировки – утолщение до 50, 70 и 90 нм	Электронная микроскопия семенных канальцев	Сумчатый барсук
Allen et al., 1996	Тороиды 30.6–50.2 нм	Атомно-силовой микроскоп	Плазмидная ДНК

#### Подготовка образцов для электронно-микроскопического анализа

Очищенную по стандартной методике суспензию сперматозоидов осаждали центрифугированием, ресуспендировали в физиологическом растворе хлорида натрия и добавляли глютаровый альдегид до концентрации 0.5%, после чего суспензию вновь осаждали центрифугированием, удаляли надосадочную жидкость и фиксировали 2.5% глютаровым альдегидом на какодилатном буфере. Зафиксированные образцы обезвоживали и пропитывали эпоксидной смолой по стандартной методике.

Ультратонкие срезы готовили с помощью алмазного ножа на ультратоме Reichert Jung Ultracut E. Срезы монтировали на сетки для электронной микроскопии, контрастировали 1% водным раствором уранил-ацетата и раствором цитрата свинца. Полученные препараты изучали и фотографировали с помощью электронного микроскопа Hitachi H-700H.

Для проведения измерений негативы сканировали с разрешением 471 точки на сантиметр. Изме-

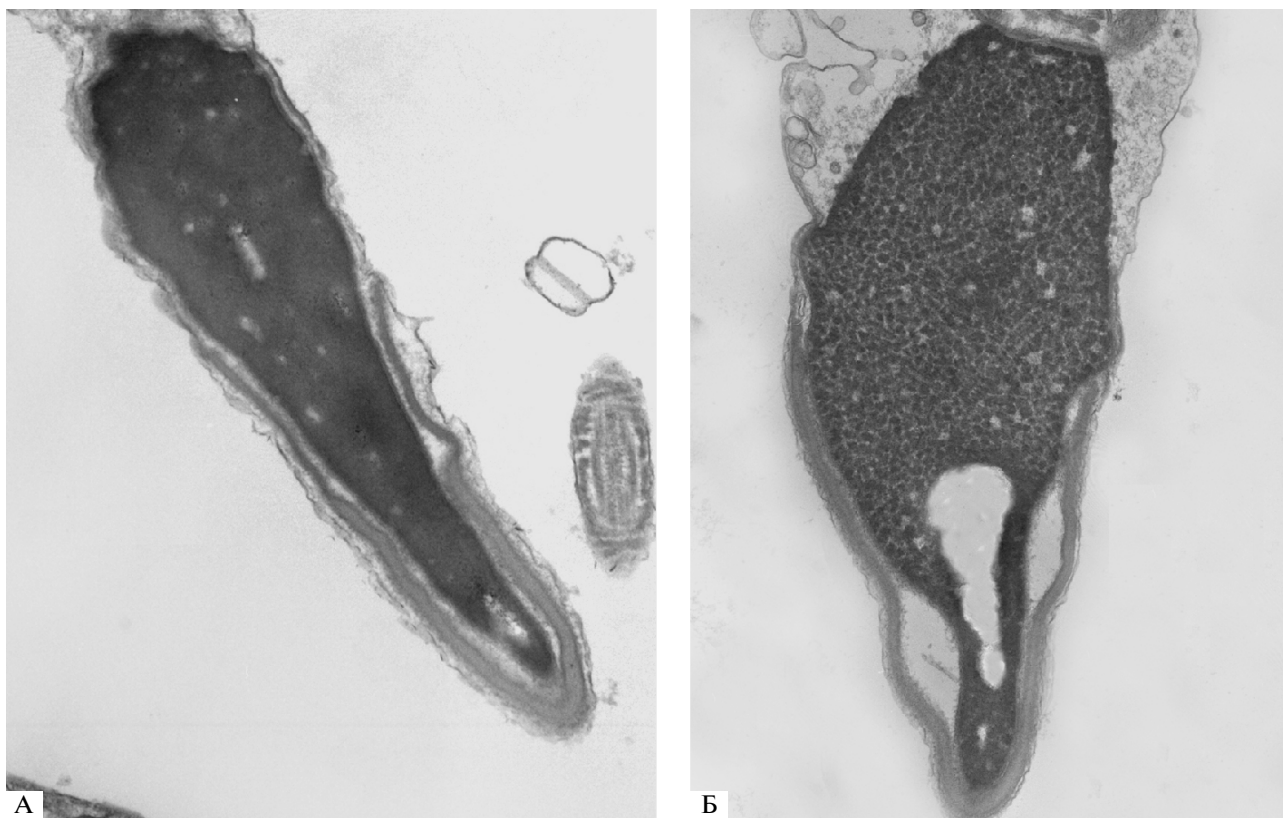
рения и денситометрическое профилирование осуществляли с помощью программы ImageJ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### 1. Структурная организация хроматина в дифференцирующихся сперматиде

В зрелых, завершивших дифференцировку сперматозоидах, основную часть головки занимает ядро с компактно упакованным хроматином, в котором не удается визуализировать дискретных структурных элементов (рис. 1). В норме доля таких сперматозоидов составляет примерно 90% от общего количества клеток в эякуляте. Помимо нормальных клеток в эякуляте здоровых доноров в небольшом количестве встречаются сперматозоиды, которые по структуре ядер резко отличаются от нормы: хроматин таких клеток частично декомпактизован и имеет вид фибрилл толщиной около 40 нм. В литературе хроматин такого типа принято называть “незрелым” (Chemes, 2000; Piasecka et al., 2006).

У некоторых инфертильных пациентов доля сперматозоидов с незрелым хроматином резко



**Рис. 1.** Структура ядер нормальных и патологических сперматозоидов. А — нормальный сперматозоид, хроматин имеет вид однородной плотной массы, с небольшими лакунарными включениями. Б — патологический сперматозоид с “незрелым” хроматином, хроматин представлен анастомозирующими фибриллами диаметром около 40 нм.

возрастает, достигая в ряде случаев 70–80% (Брагина и др., 2009). Такого рода патология иногда сопровождается значительным (по сравнению с нормой) увеличением в эякуляте доли сперматид, находящихся на различных стадиях дифференцировки. От зрелых сперматозоидов сперматиды отличаются по форме клеток и ядер, по строению акросомы и по структуре хроматина.

В связи с тем, что для ультраструктурного анализа принципиальное значение имеет сохранность структурно-функциональной нативности модели, мы проводили предварительный отбор образцов спермы с минимальной долей патологических клеток. С этой целью использовали общепринятые тесты, характеризующие жизнеспособность клеток: окраску эозином, выявляющую некротические клетки, метод TUNEL, позволяющий выявить разрывы ДНК, и электронную микроскопию, с помощью которой оценивали долю клеток с незрелым хроматином.

Полученные данные показывают, что во всех изученных образцах доля клеток, окрашивающихся эозином (мертвые клетки) всегда выше доли клеток, содержащих разрывы ДНК (рис. 2). Иная ситуация наблюдается при сравнении доли мертвых клеток и клеток с незрелым хроматином.

В этом случае возможны различные варианты: количество мертвых клеток и клеток с незрелым хроматином может быть одинаковым (образцы № 3 и 9), могут преобладать клетки с незрелым хроматином (образцы № 1, 2, 4, 8 и 11) или мертвые клетки (образцы № 5, 6, 7 и 10). Наиболее важные данные получены при сравнении доли клеток с разрывами ДНК и клеток с незрелым хроматином. В этом варианте в трех образцах (№ 5, 7 и 10) преобладают клетки с разрывами ДНК, а в остальных — клетки с незрелым хроматином. При этом в образцах, которые имеют сперматозоиды с незрелым хроматином, клеток с разрывами может быть очень мало (№ 8) или они вообще отсутствуют (№ 11). В целом полученные результаты свидетельствуют об отсутствии положительной корреляции между количеством клеток с разрывами ДНК и сперматозоидов с незрелым хроматином. На основе предварительных экспериментов для последующего электронномикроскопического анализа были отобраны образцы спермы, взятой у доноров № 8, 4 и 11.

Помимо морфологически нормальных сперматид в эякуляте этих доноров обнаружено незначительное количество клеток с признаками некротических изменений: с выраженной деградацией

ядер, частичным лизисом плазматических мембран и набуханием митохондрий (рис. 3). Для изучения структуры хроматина использовали только те клетки, которые не имеют признаков некротической дегенерации.

По характерной структуре ядерного компартамента в отобранных образцах мы идентифицировали 3 основных типа сперматид (рис. 4).

Тип 1 — сперматиды, в ядрах которых хроматин представлен фибриллами толщиной около 8 нм, гомогенно распределенными в кариоплазме (рис. 4А).

Тип 2 — сперматиды, в ядрах которых хроматин представлен фибриллами толщиной около 8 нм и глобулярными структурами со средним диаметром около 60 нм (рис. 4Б, 5). Количественное соотношение 8 нм фибрилл и 60 нм глобул в клетках этого типа значительно варьирует. В некоторых сперматиде преобладают тонкие фибриллы, в большинстве клеток глобулы заполняют практически весь объем ядер. Во всех типах клеток глобулы имеют одинаковое строение: они представляют собой скопления электронно-плотного материала, который является центром ассоциации фибрилл толщиной 8 нм. В некоторых случаях между индивидуальными глобулами удается наблюдать тонкие линкерные фибриллы. Визуально и по данным денситометрии плотность 8 нм фибрилл в составе глобул выше по сравнению с их плотностью в кариоплазме (рис. 6).

В ядрах сперматид типа 3 хроматин имеет преимущественно фибриллярную организацию, с толщиной фибрилл около 40 нм (рис. 4В, 5).

Особый интерес для анализа представляют сперматиды, которые по структурной организации хроматина занимают промежуточное положение между типами 2 и 3 (рис. 6В, 6Г). Как следует из данных денситометрии, уменьшение толщины фибрилл на этой стадии дифференцировки связано с увеличением степени компактизации материала. В некоторых ядрах прослеживаются элементы спиральной организации фибрилл хроматина. Хроматин таких сперматид имеет несколько характерных особенностей. Его основными структурными элементами являются фибриллы толщиной около 30 нм и глобулы того же диаметра. Глобулы располагаются преимущественно в базальной зоне ядра, а фибриллы — в апикальной, при этом общая компактность хроматина выше в апикальной зоне, которая примыкает к акросоме. От глобул и фибрилл радиально расходятся тонкие 8 нм фибриллы.

Данные, суммирующие изменения основных параметров фибрилл хроматина от ранних стадий дифференцировки до зрелых сперматид, представлены на графике (рис. 5).

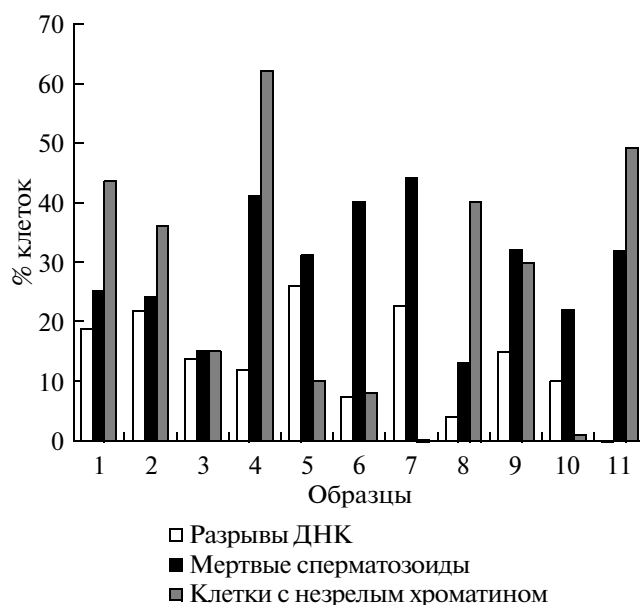
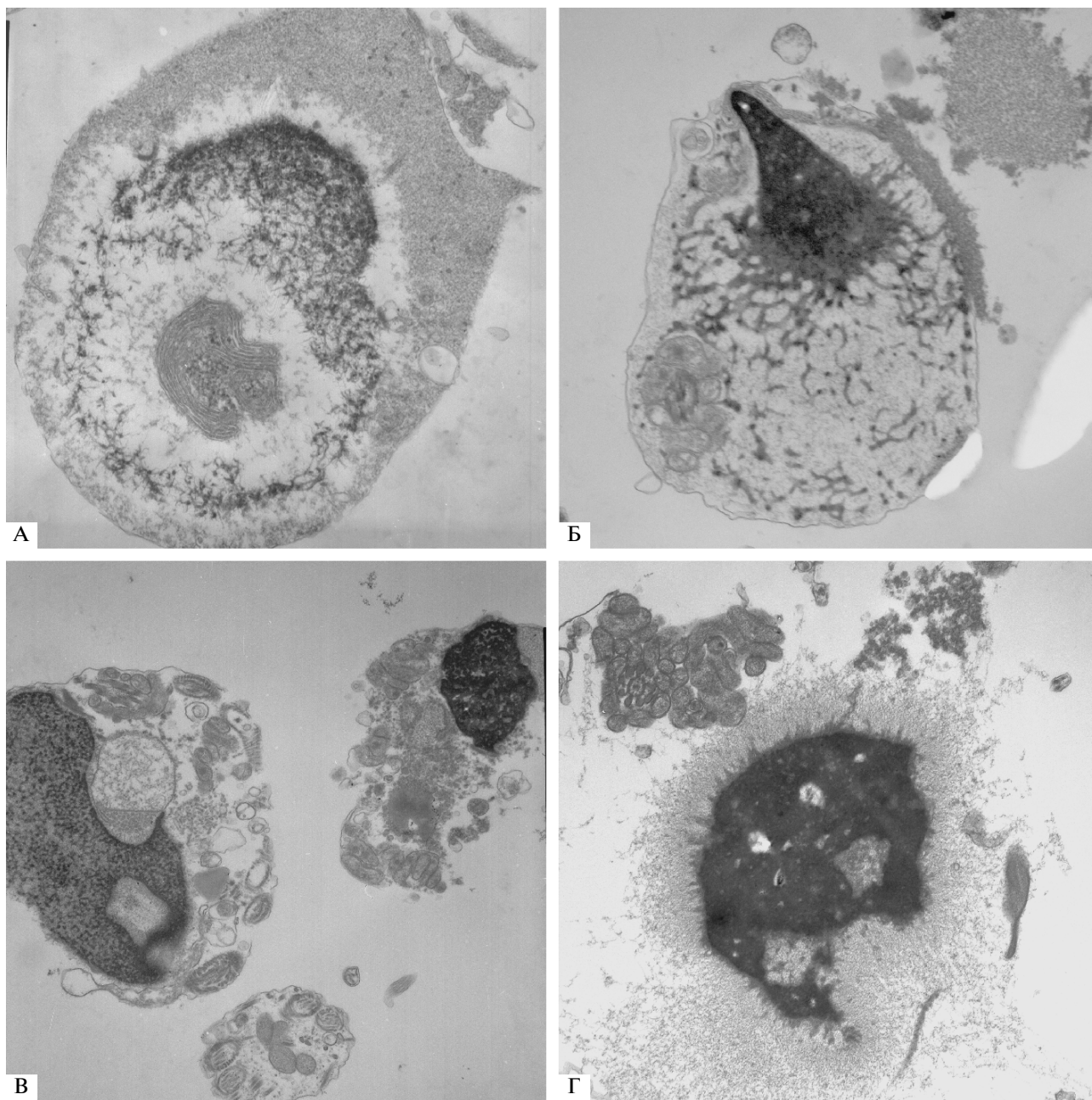


Рис. 2. Анализ содержания сперматозоидов с разрывами ДНК, мертвых сперматозоидов и сперматозоидов с незрелым хроматином в образцах спермы, взятой у инфертильных пациентов.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Динамику изменений структуры хроматина в процессе дифференцировки сперматид можно описать следующим образом. В ядрах ранних сперматид хроматин полностью декомпактизован, его структурной единицей является фибрилла толщиной около 8 нм. На начальных стадиях дифференцировки эта “элементарная” фибрилла является преобладающей структурой ядер, на последующих этапах она постепенно замещается крупными глобулярными комплексами диаметром около 60 нм. Начиная со стадии “промежуточных” сперматид наблюдается ассоциация глобул в фибриллярные структуры, толщина которых уменьшается до 30–40 нм. На всех стадиях дифференцировки, кроме зрелых сперматид, глобулярно-фибриллярные комплексы представляют собой центры ассоциации элементарных фибрилл. Процесс конденсации хроматина имеет векторный характер — он направлен от апикальной зоны ядра к базальной. В зрелых сперматиде преобладающим компонентом являются фибриллы толщиной около 40 нм, тонкие фибриллы практически отсутствуют. По своей структурной организации ядра зрелых сперматид полностью соответствуют ядрам сперматозоидов с “незрелым” хроматином, которые в небольшом количестве обнаруживаются в эякуляте здоровых доноров. Причина такой патологии дифференцировки остается непонятной. Возможно, в части сперматид блокируется формирование межмолекулярных дисульфидных связей, которые не-



**Рис. 3.** А–Г. Сперматиды в эякуляте инфертильных пациентов, находящиеся на различных стадиях некротической гибели.

обходимы для завершающей фазы компактизации генома.

Полученные результаты принципиально важно сопоставить с данными ранних работ, в которых методом иммуноэлектронной микроскопии на материале биопсий семенников человека изучали динамику распределения гистонов, транзиторных белков и протаминов в дифференцирующихся сперматиде (Prigent et al., 1996, 1998).

Для описания динамики структурных преобразований хроматина мы будем придерживаться

классификации стадий спермиогенеза, принятой в цитированных работах.

Авторы показали, что гистоны H2В и H3 присутствуют в ядрах до стадии зрелых сперматид (по морфологическим признакам эта стадия соответствует типу 3 сперматид на наших препаратах). При этом плотность распределения метки на  $1 \text{ мкм}^2$  возрастает на стадии 4 и 5 (соответствуют сперматидам типа 2 на наших препаратах) и резко уменьшается на стадии 6 (соответствуют сперматидам типа 3 на наших препаратах). По интерпрета-

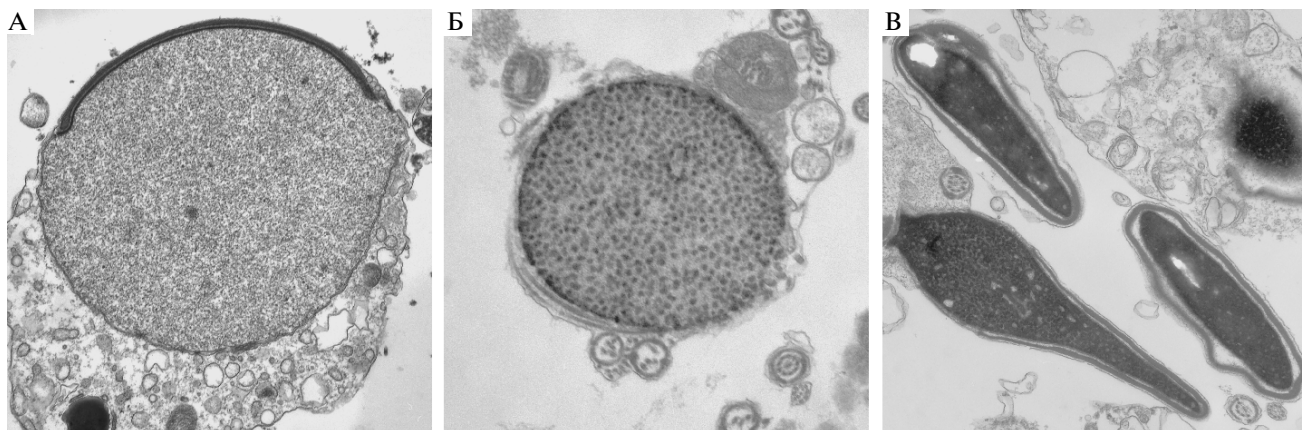


Рис. 4. А–В. Выявленные типы сперматид в эякулятах.

А – тип 1, диффузный хроматин представлен фибриллами диаметром 20 нм.

Б – сперматиды типа 2, хроматин имеет глобулярно-фибрилярную организацию.

В – сперматиды типа 3, хроматин имеет фибриллярную организацию. Основным элементом – фибрилла диаметром 40 нм.

ции авторов возрастание плотности метки может быть связано с синтезом гистонов, однако более вероятно, что на этих стадиях увеличение плотности метки объясняется прогрессирующей компактизацией хроматина. Транзиторные белки появляются в сперматиде на стадии 4 (соответствуют сперматидам типа 2), достигают максимальных значений на промежуточных стадиях и резко уменьшаются на стадии зрелых сперматид (соответствуют сперматидам типа 3). Протамины достигают максимальных значений в зрелых сперматиде (соответствуют сперматидам типа 3). В цитированных работах не проводили анализ ультраструктуры хроматина, однако на представленных фотографиях четко видно, что антитела к гистонам преципитируют с тонкими фибриллами, по нашим измерениям толщиной около 10 нм, а антитела к транзиторным белкам и протаминам – с гранулами и фибриллами толщиной около 40–60 нм.

Вместе полученные нами данные по ультраструктуре хроматина в дифференцирующихся сперматиде и данные цитированных выше работ (Prigent et al., 1996, 1998) позволяют предложить динамическую модель организации нуклеопротаминового хроматина в сперматозоидах человека.

Базовой структурной единицей нуклеопротаминового хроматина, как и нуклеогистонового хроматина, является петлевой домен, предположительно включающий 10–50 kb ДНК. Такого рода домены описаны для хроматина соматических клеток (Razin et al., 2007) и для сперматозоидов (Shaman et al., 2007). Очевидно, что компактизация петлевых доменов предполагает наличие в хроматине структурной дискретности, тестируемой морфологическими методами. По некоторым данным, в хромосомах соматических клеток петлевые домены формируют при участии гистона H1

или структурных белков негистонового типа дискретные глобулярные структуры – хромомеры (Zatsepina et al., 1983).

Показано, что частично депротеинизованный хромомер представляет собой комплекс, состоящий из многочисленных (15–20) петлевых структур, основания которых объединены в плотной центральной области белками негистонового типа (Prusov et al., 1983). Длина одной петли варьирует в пределах от 0.3 до 1 мкм, суммарная длина петель одного комплекса составляет 15–20 мкм (10–60 тыс. н. пар), что хорошо со-

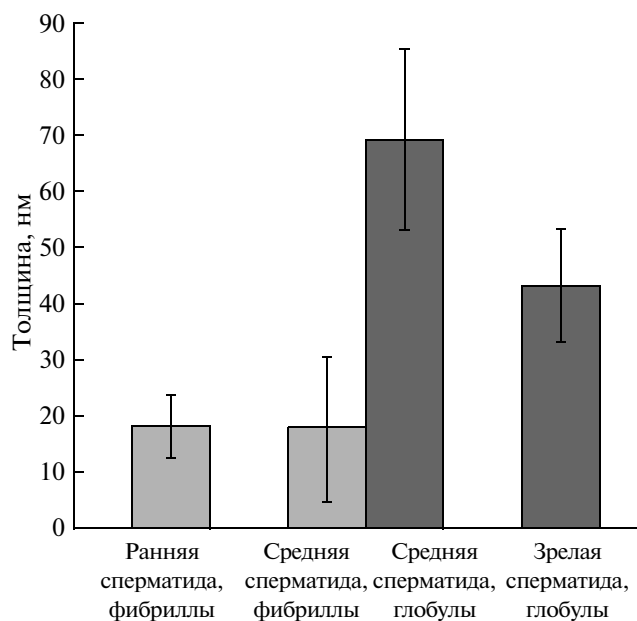
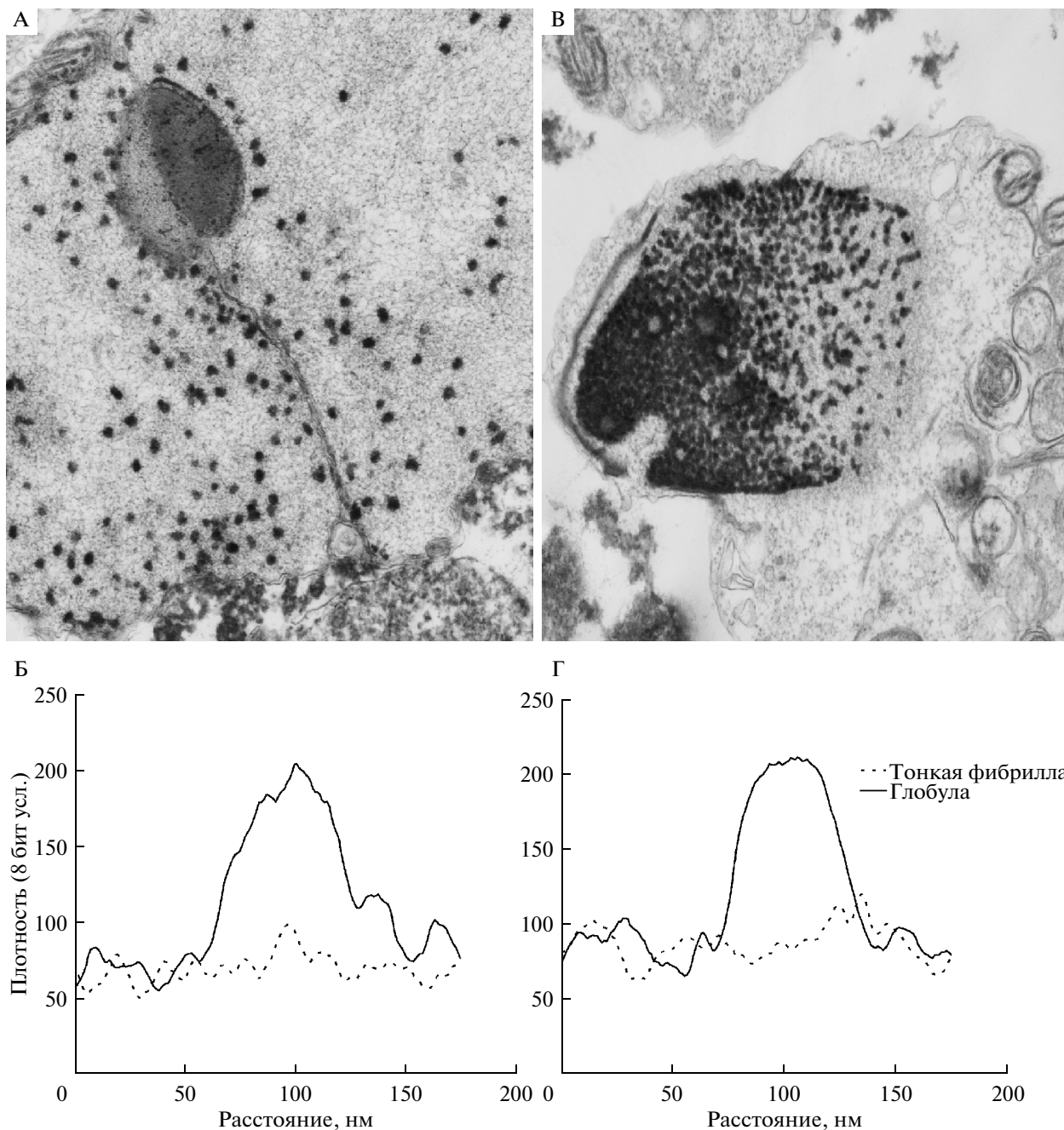


Рис. 5. Параметры фибрилл и глобулярных элементов хроматина сперматозоидов на различных стадиях спермиогенеза.



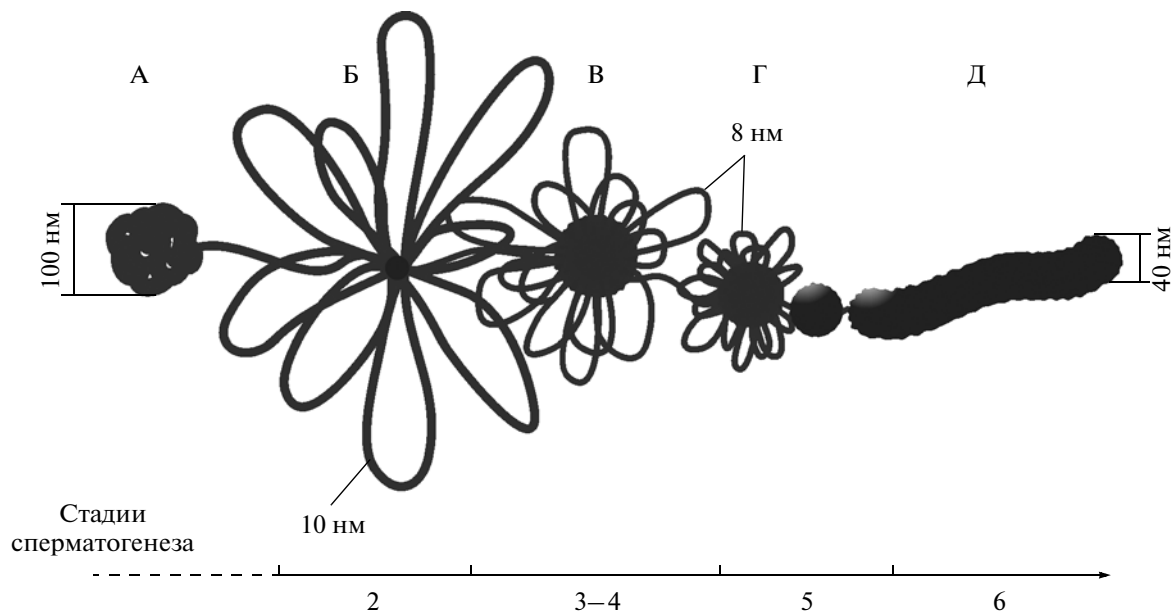
**Рис. 6.** Денситометрические профили элементов хроматина на стадиях ранних (А, Б) и “промежуточных” сперматид (В, Г).

ответствуют размерам петлевых доменов ДНК сперматозоидов.

На начальном этапе дифференцировки (предположительно, в ранних сперматидях) гистоны модифицируются, частично замещаются тестис-специфичными вариантами, в результате макромолекулярные комплексы хроматина декомпактизируются до “элементарных” нуклеосомных фибрилл (Oliva, 2006). Основной постулат предлагаемой нами модели — хромомеры разворачиваются

не полностью, так что основания частично релаксированных петель остаются фиксированными на белках ядерного матрикса. Все дальнейшие события, а именно, репарирование однонитевых разрывов ДНК, деструкция нуклеосом, связывание ДНК с транзиторными белками и протаминами и реконденсация хроматина, инициируются в локальных участках ядер, соответствующих зонам фиксации петлевых доменов. В структурном отношении эти участки представляют собой скопления





**Рис. 7.** Динамика структурных преобразований хроматина в ходе дифференцировки сперматид.

А — нуклеогистоновый хроматин ядер ранних сперматид представлен фибриллами толщиной около 25–30 нм, упакованными в дискретные глобулярные комплексы — хромомеры — диаметром 70–100 нм.

Б — на ранних стадиях спермиогенеза хромомеры разворачиваются, высвобождая нуклеогистоновую фибриллу диаметром 10 нм. При этом дискретность упаковки ДНК сохраняется, реализуясь в виде розеткоподобных доменов. Начинается замена гистонов на транзиторные белки.

В — замещение транзиторных белков протаминами приводит к уменьшению диаметра фибрилл ДНП до 8 нм, формируются зоны конденсации хроматина.

Г — последовательная упаковка розеткоподобных доменов в глобулы диаметром 40 нм.

Д — объединение глобул в фибриллу диаметром 40 нм за счет формирования дисульфидных связей между молекулами протаминов на финальной стадии созревания сперматозоидов.

электронно плотного материала, в который включены фрагменты “элементарных” 8 нм фибрилл (рис. 7). Характерное расположение 8 нм фибрилл, расходящихся от глобул в радиальном направлении, является косвенным аргументом в пользу того, что в этих зонах располагаются основания петлевых доменов ДНК. В то же время, неопределенная форма, высокая гетерогенность по размерам и ограниченное время существования показывают, что глобулярные комплексы являются скорее транзиторными элементами, чем структурно-функциональными доменами хроматина. Возможно, плотный компонент этих комплексов создается за счет высокой концентрации белков (транзиторных белков и/или белков ядерного матрикса, в том числе, топоизомеразы), и протаминов, замещающих эти белки.

Наиболее загадочной в процессе ремоделирования хроматина остается функциональная роль транзиторных белков TP1 и TP2. В экспериментах *in vitro*, показано, что TP1 понижает температуру плавления ДНК, релаксирует ДНК в коровых частицах нуклеосом, стимулирует релаксирующую активность топоизомеразы I и репарацию однонитевых разрывов ДНК (Meistrich et al., 2003). Воз-

можно, присутствие этого белка в машинерии ремоделирования генома необходимо для релаксации ДНК перед ее суперкомпактизацией в нуклеопротаминовом хроматине.

На более поздних этапах дифференцировки структурная организация хроматина существенно перестраивается. Границы между отдельными глобулярными комплексами “размываются”, постепенно уменьшается доля 8 нм фибрилл и хроматин приобретает преимущественно фибриллярную форму. В зрелых сперматиде хроматин представлен только фибриллами толщиной около 40 нм. На этой стадии дифференцировки в 40 нм фибриллах прослеживаются элементы спиральной организации.

В зрелых сперматозоидах нуклеопротаминовый хроматин за счет формирования межмолекулярных дисульфидных связей переходит в состояние однородной по плотности массы, в которой не удастся идентифицировать отдельных структурных элементов. Схема, иллюстрирующая динамику изменений структуры хроматина в процессе дифференцировки сперматид человека представлена на рисунке 7. Возникает вопрос, как эта модель согласуется с современными представлениями об орга-

низации нуклеопротаминового хроматина? К сожалению, в доступной литературе практически отсутствуют данные о динамике формирования нуклеопротаминового хроматина в дифференцирующихся сперматидях человека, фиксированных *in situ*. Как говорилось выше, наши наблюдения полностью соответствуют фотографиям, представленным в работах Prigent et al. (1996, 1998), однако авторы не обсуждают структурные аспекты проблемы.

Что касается организации искусственно деконденсированного хроматина, то в этой области разброс данных сопоставимы (см. таблицу 1). Как правило, после искусственной деконденсации в хроматине выявляется иерархия фибрилл: тонкие (от 6 до 30 нм) и толстые (от 45 до 120 нм). Такой разброс данных, по-видимому, связан с использованием различных деконденсирующих реагентов и/или объектов исследования. Наиболее популярная тороидальная модель упаковки нуклеогистонов хроматина (Ward, Ward, 2004) основана на данных, полученных *in vitro*, и до настоящего времени не подтверждена экспериментально.

Работа выполнена при финансовой поддержке Президента РФ (грант МК-1332.2010.4).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Брагина Е.Е., Замятнина В.А., Бочарова Е.Н., Шилейко Л.В., Курило Л.Ф., Гусак Ю.К., Поляков В.Ю. Количественное ультраструктурное исследование хроматина сперматозоидов при нарушении фертильности // Андрол. и генит. Хирургия. 2009. № 1. С. 44–49.
- Зацепина О.В., Поляков В.Ю., Ченцов Ю.С. Электронно-микроскопическое исследование хромомером в митотических и интерфазных хромосомах // Цитология. 1983. Т. 25. С. 123–120.
- Ченцов Ю.С., Поляков В.Ю. Ультраструктура клеточного ядра. М.: Наука, 1974. 152 с.
- Ченцов Ю.С., Бураков В.В. Хромонема – забытый уровень укладки хроматина в митотических хромосомах // Биол. мембраны. 2005. Т. 22. С. 178–187.
- Poliakov V.Y., Vasin V.I., Chentsov Y.S. Principles of structural organization of mitotic chromosomes in several higher plants // Tsitologiya. 1969. V. 11. № 12. P. 1477–1484.
- Allen M.J., Lee C., Lee J.D. 4th, Pogany G.C., Balooch M., Siekhaus W.J., Balhorn R. Atomic force microscopy of mammalian sperm chromatin // Chromosoma. 1993. V. 102. № 9. P. 623–630.
- Allen M.J., Lee J.D. 4th, Lee C., Balhorn R. Extent of sperm chromatin hydration determined by atomic force microscopy // Mol Reprod Dev. 1996. V. 45. № 1. P. 87–92.
- Belmont A.S., Bruce K. Visualization of G1 chromosomes: a folded, twisted, supercoiled chromonema model of interphase chromatid structure // J. Cell Biol. 1994. V. 127. № 2. P. 287–302.
- Carell D.T., Emery B.R., Hammond S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? // Hum. Reprod. Update. 2007. V. 13. № 3. P. 313–327.
- Chemes H.E. Phenotypes of sperm pathology: genetic and acquired forms in infertile men // J. Androl. 2000. V. 21. № 6. P. 799–808.
- Haaf T., Ward D.C. Higher order nuclear structure in mammalian sperm revealed by *in situ* hybridization and extended chromatin fibers // Exp. Cell Res. 1995. V. 219. № 2. P. 604–611.
- Hud N.V., Allen M.J., Downing K.H., Lee J., Balhorn R. Identification of the elemental packing unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993. V. 193. № 3. P. 1347–1354.
- Meistrich M.L., Mohapatra B., Shirley C.R., Zhao M. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis // Chromosoma. 2003. V. 111. № 8. P. 483–488.
- Mudrak O., Tomilin N., Zalensky A. Chromosome architecture in the decondensing human sperm nucleus // J. Cell Sci. 2005. V. 118. № 19. P. 4541–4550.
- Oliva R. Protamines and male infertility // Hum. Reprod. Update. 2006. V. 12. № 4. P. 417–435.
- Piasecka M., Gaczarzewicz D., Laszczyska M. Evaluation of sperm genomic integrity of normozoospermic men: a prospective study // Folia Histochem. Cytobiol. 2006. V. 44. № 2. P. 117–122.
- Prigent Y., Muller S., Dadoune J.P. Immunoelectron microscopic distribution of histones H2B and H3 and protamines during human spermiogenesis // Mol. Hum. Reprod. 1996. V. 2. № 12. P. 929–935.
- Prigent Y., Troalen F., Dadoune J.P. Immunoelectron microscopic visualization of intermediate basic proteins HPI1 and HPI2 in human spermatids and spermatozoa // Reprod. Nutr. Dev. 1998. V. 38. № 4. P. 417–427.
- Prusov A.N., Polyakov V.Y., Zatssepina O.V., Chentsov Y.S., Fais D. Rosette-like structures from nuclei with condensed (chromomeric) chromatin but not from nuclei with diffuse (nucleomeric or nucleosomic) chromatin // Cell Biol. Int. Rep. 1983. V. 7. № 10. P. 849–858.
- Razin S.V., Iarovaia O.V., Sjakste N., Sjakste T., Bagdoniene L., Rynditch A.V., Eivazova E.R., Lipinski M., Vassetzky Y.S. Chromatin domains and regulation of transcription // J. Mol. Biol. 2007. V. 369. № 3. P. 597–607.
- Richmond T.J., Davey C.A. The structure of DNA in the nucleosome core // Nature. 2003. V. 423. № 6936. P. 145–150.
- Shaman J.A., Yamauchi Y., Ward W.S. Function of the sperm nuclear matrix // Arch. Androl. 2007. V. 53. № 3. P. 135–140. Review.
- Sheval E.V., Prusov A.N., Kireev I.I., Fais D., Polyakov V.Y. Organization of higher-level chromatin structures (chromomere, chromonema and chromatin block) examined using visible light-induced chromatin photostabilization // Cell Biol. Int. 2002. V. 26. № 7. P. 579–591.
- Sobhon P., Thungkasemvathana P., Tanphaichitr N. Electron microscopic studies of rat sperm heads treated with

- urea, dithiothreitol, and micrococcal nuclease // *Anat. Rec.* 1981. V. 201. № 2. P. 225–235.
- Sobhon P., Tanphaichitr N., Chutatape C., Vongpayabal P., Panuwatsuk W.* Electron microscopic and biochemical analyses of the organization of human sperm chromatin decondensed with sarkosyl and dithiothreitol // *J. Exp. Zool.* 1982. V. 223. № 3. P. 277–290.
- Thoma F., Koller T., Klug A.* Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin // *J. Cell Biol.* 1979. V. 83. № 2(1). P. 403–427.
- Wagner T.E., Yun J.S.* Fine structure of human sperm chromatin // *Arch. Androl.* 1979. V. 2. № 4. P. 291–294.
- Ward M.A., Ward W.S.* A model for the function of sperm DNA degradation // *Reprod. Fertil. Dev.* 2004. V. 16. № 5. P. 547–554.
- Worawittayawong P., Leigh C., Weerachatanukul W., Manochantr S., Sobhon P., Breed W.G., Sretarugsa P.* Changes in distribution of basic nuclear proteins and chromatin organization during spermiogenesis in the greater bandicoot rat, *Bandicota indica* // *Cell Tissue Res.* 2008. V. 334. № 1. P. 135–144.

## Chromatin Folding in Human Spermatozoa. I. Dynamics of Chromatin Remodelling in Differentiating Human Spermatids

E. A. Arifulin<sup>a</sup>, E. E. Bragina<sup>b</sup>, V. A. Zamyatnina<sup>b</sup>, E. G. Volkova<sup>a</sup>, E. V. Sheval<sup>b</sup>, S. A. Golyshev<sup>b</sup>, L. N. Kinzurashvili<sup>b</sup>, G. I. Kirianov<sup>b</sup>, A. N. Prusov<sup>b</sup>, and V. Yu. Polyakov<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Bioengineering and Bioinformatics, Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

<sup>b</sup> Belozerskii Institute of Physicochemical Biology, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia  
e-mail: sergei.golyshev@mail.genebee.msu.ru

**Abstract**—Changes in chromatin structure at different stages of differentiation of human spermatids were studied. It was shown that, in nuclei of early spermatids, chromatin is loosely packed and its structural element is an 8-nm fiber. This “elementary” fiber is predominant at the initial stages of differentiation; in the course of maturation, it is replaced by globular elements approximately 60 nm in diameter. In intermediate spermatids, these globules start to condense into fibrillar aggregates and reduce their diameter to 30–40 nm. At all stages of spermatid maturation, except the final stages, these globules are convergence centers for elementary fibers. This remodelling process is vectored and directed from the apical (acrosomal) to the basal pole of the nucleus. In mature spermatids, the elementary 8-nm fibers are almost absent and the major components are 40-nm fibrillar aggregates. The nuclei of mature spermatids are structurally identical with the nuclei of spermatozoa with the so-called “immature chromatin,” which are commonly found in a low proportion in sperm samples from healthy donors and may prevail over the normal cells in spermiogenetic disorders. The cause of this differentiation blockade remains unknown. Possibly, the formation of intermolecular bonds between protamines, which are required for the final stages of chromatin condensation, is blocked in a part of spermatids. The results of this study are discussed in comparison with the known models of nucleoprotamine chromatin organization in human spermatozoa.

**Keywords:** chromatin, DNA, spermiogenesis, spermatid, histones, protamines, supramolecular organization.