

## РОЛЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК И ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ ГИСТОНОВ В ОРГАНИЗАЦИИ И ПОДДЕРЖАНИИ СТРУКТУРЫ ГЕТЕРОХРОМАТИНОВЫХ ДОМЕНОВ (ХРОМОЦЕНТРОВ)

© С. А. Голышев,<sup>1</sup> П. Н. Вихрева, Е. В. Шеваль, Г. И. Кирьянов, В. Ю. Поляков

*Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета;*  
<sup>1</sup> *электронный адрес: sergei.golyshev@mail.genebee.msu.ru*

В работе изучено влияние ингибиторов метилирования ДНК (5-азациитидина) и ацетилирования гистонов (трихостатина А) на структурную организацию блоков конститутивного гетерохроматина (хромоцентров) в ядрах клеток трансформированных фибробластов мыши L929. После инкубации с 5-азациитидином в 85 % клеток компактные хромоцентры преобразуются в протяженные фибриллы. Гипотоническая обработка клеток приводит к распаду фибрилл на tandemно расположенные глобулы, различимые в световом микроскопе при окраске АТ-специфичными красителями (DAPI). Аналогичные глобулярные структуры выявляли при гипотонической обработке интактных клеток. После инкубации клеток с трихостатином А в 25 % клеток хромоцентры перестают выявляться как обособленные структуры. Искусственная декомпактизация сохранившихся хромоцентров приводит к их преобразованию в кольцевые структуры, в которых не выявляются глобулярные элементы. Полученные данные обсуждаются в связи с гипотезой о различных функциях эпигенетических факторов в процессе многоуровневой компактизации и поддержании компактного состояния гетерохроматина.

Ключевые слова: гетерохроматин, хромоцентр, метилирование ДНК, метилирование гистонов, ацетилирование гистонов, структура хроматина, ингибиторный анализ.

Принятые сокращения: 5-аза-С — 5-азациитидин; БрДУ — 5-бромодезоксиуридин, ТСА — трихостатин А, DABCO — 1,4-диазабцикло[2.2.2]октан, DAPI — 4',6-диамидино-2-фенилиндо́л, HP1 $\alpha$  — heterochromatin protein 1 $\alpha$ .

В настоящее время в составе генома эукариот принято выделять три фракции хроматина, различающиеся по своему молекулярно-генетическому статусу: конститутивный гетерохроматин, факультативный гетерохроматин и эухроматин (Craig, 2004). Основные особенности конститутивного гетерохроматина — наличие нетранскрибирующейся (в том числе сателлитной) гиперметилированной ДНК, гипоацетилированных гистонов, специфических ансамблей негистоновых белков, обладающих репрессорной и компактизирующей функциями, и триметилированного по 9-му остатку лизина гистона H3 (Jeppesen et al., 1992; Eissenberg, Elgin, 2000; Rea et al., 2000; Peters et al., 2001; Taddei et al., 2001; Craig, 2004; Fuks, 2005; Metzger et al., 2005; Smallwood et al., 2007).

Фракция эухроматина включает в себя большинство транскрипционно-активных генов, ДНК в ее составе слабо метилирована. Факультативный гетерохроматин — это временно инактивированные эухроматиновые локусы хромосом, которые по своему молекулярному статусу сходны с конститутивным гетерохроматином. На этом основании временная инактивация транскрипционно-активных участков хромосом иногда рассматривается как «гетерохроматинизация» (Goto, Monk, 1998), что по существу предполагает полную идентичность в организации локусов конститутивного и факультативного гетерохроматина. Это означает, что должны существовать

значительные различия в характере компактизации ДНК эухроматина и обеих фракций гетерохроматина. Действительно, обработка нуклеазами активированных, гетерохроматинизированных и «гетерохроматинизированных» локусов хромосом показала, что ДНК гетерохроматина обладает меньшей доступностью для гидролиза по сравнению с эухроматином. На нуклеосомном уровне компактизации ДНК эти различия проявляются в более регулярном расположении октамеров гистонов и в стабилизации длины линкерных участков молекулы ДНК (Sun et al., 2001).

Вопрос о том, как процессы «гетерохроматинизации» и(или) активации хроматина влияют на более высокие уровни компактизации ДНК, остается открытым. Одним из возможных подходов к решению этой проблемы может быть детальный анализ хроматина, который по своему молекулярно-генетическому статусу соответствует гетерохроматину и который легко доступен для визуализации при светооптической и электронной микроскопии. Наиболее перспективным в этом отношении является конститутивный гетерохроматин, выявляемый в ядрах клеток некоторых грызунов в виде крупных блоков — хромоцентров (Прокофьева-Бельговская, 1986).

Задачей данной работы является изучение влияния уровня метилирования ДНК и посттрансляционных модификаций гистонов на структурную организацию консти-

тутивного гетерохроматина (хромоцентров) в ядрах трансформированных фибробластов мыши L929.

В работе показано, что макромолекулярная организация конститутивного гетерохроматина в составе хромоцентров связана с уровнем метилирования ДНК и характером энзиматической модификации гистонов. Полученные результаты обсуждаются в связи с предположением о том, что архитектура блоков конститутивного гетерохроматина определяется и поддерживается несколькими различными и относительно не зависимыми друг от друга молекулярными механизмами.

### Материал и методика

Культивирование клеток. Мышинные фибробласты L929 (Российская коллекция клеточных культур позвоночных, Санкт-Петербург) культивировали на среде DMEM (Пан-Эко) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Hy-Clone, США) и противомикробно-противогрибкового препарата (Sigma, США) при 37 °С в атмосфере, содержащей 5 % CO<sub>2</sub>. Для проведения экспериментов клетки рассаживали на покровные стекла. Спустя 24 ч после посева в среду культивирования клеток вносили 50 мкМ 5-азациитидина (5-аза-Ц) либо 50 нг/мл трихостатина А (ТСА). Для поддержания постоянной концентрации 5-аза-Ц и ТСА каждые 24 ч среду культивирования заменяли на свежую и вновь вносили соответствующие аликвоты ингибиторов. Также проводили эксперименты с удалением ингибиторов из среды культивирования после 24-часовой инкубации с последующим культивированием в течение 24 ч в чистой среде.

Гипотоническая обработка. Для изучения реакции хроматина на гипотонические условия клетки инкубировали в 30%-ном растворе Хенкса при 37 °С. После 60 мин инкубации в гипотонических условиях клетки фиксировали формальдегидом, приготовленным на том же растворе, пермеабилizировали в тех же условиях и переводили в PBS.

Параллельно клетки переносили в среду культивирования на срок до 2 ч, после чего фиксировали 3.7%-ным формальдегидом на PBS и обрабатывали, как описано ниже.

Иммуноцитохимическое выявление HP1 $\alpha$ . Антитела против белка HP1 $\alpha$  (heterochromatin protein 1 $\alpha$ ) использовали в качестве маркера гетерохроматина. Клетки фиксировали 3.7%-ным формальдегидом на PBS 10 мин при комнатной температуре. После фиксации клеточные мембраны пермеабилizировали 10 мин 0.5%-ным раствором Triton X-100 на PBS и тщательно промывали PBS. Фиксированные клетки инкубировали в течение 12 ч в 1%-ном растворе BSA на PBS при 4 °С. Далее препараты инкубировали с антителами против HP1 $\alpha$  (Euromedex, клон 2H $\alpha$ -1H5-As, титр 1 : 100, разведение на PBS с добавлением 0.05 % по объему Tween-20 (PBS-T)) в течение 1 ч при комнатной температуре, промывали PBS-T 3 раза по 5 мин и переносили в раствор антител против иммуноглобулинов мыши, конъюгированных с Alexa 488 (Invitrogen, титр 1 : 100, разведение на PBS-T), на 60 мин, после чего промывали PBS-T 3 раза по 5 мин. Затем клетки окрашивали 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) на PBS (0.1 мкг/мл). Препараты заключали в MOVIO (Calbiochem) с добавлением 1,4-дизабицикло[2.2.2]октана (DABCO).

При проведении иммуноэлектронной микроскопии фиксацию и окрашивание клеток антителами против HP1 $\alpha$  проводили в тех же условиях, что и для флуорес-

центной иммуноцитохимии. Для визуализации использовали Fab-фрагменты антител против иммуноглобулинов мыши, ковалентно связанные с наночастицами золота (NanoProbe, США), в разведении 1 : 250. Окрашивание проводили в течение 12 ч при 4 °С. После удаления избытка конъюгата PBS, содержащим 0.1 % BSA (6 смен по 10 мин), клетки фиксировали 1%-ным раствором глутарового альдегида в течение 2 ч при комнатной температуре. Серебряное усиление проводили по стандартной методике (Gilerovitch et al., 1995), после чего образцы обезвоживали и заключали в Эпон-812.

Анализ динамики клеточного цикла. Для того чтобы изучить связь морфологических изменений в ядрах, вызываемых снижением уровня метилирования ДНК, с прохождением клетками последовательных раундов репликации и клеточных делений, были проведены эксперименты с визуализацией репликационной метки, включаемой на всем протяжении клеточного цикла. Для этого 50 мкмоль 5-бромодезоксиуридина (БрДУ) вносили на 24 ч параллельно с 5-аза-С в 1-е сут инкубации. Далее клетки фиксировали непосредственно после завершения периода мечения и через 24 ч после удаления БрДУ из среды культивирования. Для обнаружения второго цикла репликации после внесения 5-аза-С вносили БрДУ спустя 24 ч после начала инкубации с 5-аза-С на 24 ч.

Для выявления БрДУ клетки фиксировали и пермеабилizировали, как описано выше. После пермеабилizации их обрабатывали 4 М HCl в течение 20 мин при комнатной температуре и тщательно отмывали в 4 сменах PBS в течение 20 мин. Инкубацию в растворе BSA не проводили. Далее инкубировали в антителах так же, как и для выявления белка HP1 $\alpha$ . Использовали антитела против БрДУ (Sigma, США), клон BU-33, разведение 1 : 100, и антитела против иммуноглобулинов мыши, конъюгированных с Alexa 488, в разведении 1 : 100 (Invitrogen, США). Анализировали характер распределения меченого материала в ядрах параллельно с анализом формы индивидуальных хромоцентров.

Для сравнения количества ДНК в ядрах клеток, обработанных 5-аза-С, и контрольных клеток использовали окрашивание DAPI. Препараты клеток фотографировали с использованием объектива 63 $\times$  (NA 1.3) и измеряли суммарную яркость флуоресценции индивидуальных ядер, вычитая суммарную яркость участка фона той же площади. Измерения проводили с помощью программы ImageJ v1.37. Спектры интенсивностей строили с помощью программы Microcal Origin 4.

Аналогично оценивали содержание HP1 $\alpha$  в клетках. Для измерений брали препараты контрольных клеток и клеток, подвергнутых действию ТСА, окрашенные антителами в одинаковых условиях.

Получение и обработка изображений. Препараты изучали при помощи инвертированного светового микроскопа Zeiss Axiovert 200M, оснащенного камерой AxioCam HRm, используя объектив 100 $\times$  1.3 Plan NeoFluar и промежуточную линзу 1.6. Серии оптических срезов регистрировали с шагом 0.25 мкм по высоте. Разрешение в плоскости X/Y составляло 0.067 мкм на 1 пиксель. Трехмерную деконволюцию серий оптических срезов осуществляли по алгоритму Regularized Inverse Filter с помощью демонстрационной версии программы AxioVision 3.1. Полученные изображения монтировали с применением программы Adobe Photoshop.

Электронная микроскопия. Клетки фиксировали 2.5%-ным глутаровым альдегидом на 0.1 М фосфатном

буфере Зеренсена (рН 7.4) в течение 60 мин, а затем 1%-ным водным тетроксидом осмия 60 мин при комнатной температуре в темноте. Фиксированные образцы обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации. В ходе обезвоживания клетки контрастировали 2%-ным раствором уранил-ацетата в 70%-ном спирте. Затем препараты подвергали стандартным процедурам ацетонового обезвоживания и пропитки Эпоном-812 (Fluka). Полимеризацию смолы проводили при 60 °С.

Ультратонкие срезы готовили с применением стеклянного ножа на ультрамикротоме Reichert Jung Ultracut E. Срезы дополнительно контрастировали 2%-ным водным раствором уранил-ацетата 20 мин и цитратом свинца по Рейнольдсу (Reynolds, 1963). Изучали и фотографировали полученные препараты при помощи просвечивающих электронных микроскопов HU-11В и Н-700 (Hitachi, Япония). Негативы сканировали с разрешением 1200 пикселей на 1 дюйм.

## Результаты

Хромоцентры интактных клеток D929, фиксированных *in situ*, представляют собой ярко окрашивающиеся красителем DAPI плотные, крупные (до 1.5 мкм диаметром) округлой формы блоки, хорошо различимые на фоне остального хроматина, представленного тонкими тяжами и глобулами одинакового диаметра. Как правило, хромоцентры располагаются вблизи ядрышек и на периферии ядер (рис. 1, *a*). Окрашивание клетки антителами против HP1 $\alpha$ , одного из основных маркеров конститутивного гетерохроматина, демонстрирует однородное распределение этого белка внутри индивидуальных хромоцентров (рис. 1, *a'*, *a''*). В то же время области хромоцентров, декорированные антителами к HP1 $\alpha$ , имеют более четкие контуры, чем соответствующие им DAPI-позитивные блоки.

Помимо хромоцентров небольшое количество HP1 $\alpha$  выявляется в виде точечных нуклеоплазматических фокусов с низкой по сравнению с хромоцентрами интенсивностью окрашивания (рис. 1, *a'*).

Электронно-микроскопический анализ показал, что в ядрах клеток L929 можно идентифицировать три фракции конденсированного хроматина: хроматин, примыкающий к ядерной оболочке, зоны конденсированного хроматина, расположенные в кариоплазме, и крупные блоки, примыкающие к ядерной оболочке и ассоциированные с ядрышками. Структура и плотность упаковки ДНП-фибрилл в этих фракциях хроматина идентичны (рис. 2, *a*). По форме, характерному расположению в кариоплазме и размерам эти блоки конденсированного хроматина наиболее хорошо соответствуют хромоцентрам, выявляемым на светооптическом уровне. Для более точной идентификации хромоцентров на ультраструктурном уровне была проведена иммуноэлектронная визуализация распределения HP1 $\alpha$  (рис. 2, *b*). Полученные данные показывают, что гранулы золота, декорирующие антитела против HP1 $\alpha$ , преимущественно выявляются в составе округлых блоков конденсированного хроматина, что позволяет надежно отождествить их с хромоцентрами.

Интересно, что области конденсированного хроматина, не входящие в состав хромоцентров, практически не декорируются антителами против HP1 $\alpha$ . В то же время значительное количество золотых частиц выявляется в нуклеоплазме, преимущественно на периферии неболь-

ших блоков конденсированного хроматина или в областях, заполненных тонкофибрилярным материалом, что соответствует наличию нуклеоплазматического окрашивания, выявляемого методом флуоресцентной микроскопии. Незначительно количество гранул золота обнаруживается также в ядрышках и в цитоплазме (рис. 2, *b*).

Обработка клеток 5-аза-С приводит к снижению уровня метилирования ДНК, однако известно, что необходимым условием для гипометилирования всей (или большей части) ДНК генома является способность клеток проходить два раунда репликации в присутствии ингибитора ДНК-метилазы 5-аза-С (Castilho et al., 1999; Christman, 2002; Bailis, Forsburg, 2003).

В наших экспериментах введение 5-аза-С приводит к резкому снижению уровня пролиферации: через 24 ч после внесения 5-аза-С в популяции перестают выявляться делящиеся клетки. Это означает, что 5-аза-С обладает выраженным цитостатическим действием. В связи с этим возникает принципиальный вопрос о способности клеток линии L929 в присутствии 5-аза-С осуществлять репликацию ДНК. Для ответа на этот вопрос был проведен анализ динамики включения репликационной метки (БрдУ) в контроле и на фоне действия 5-аза-С (рис. 3, *a*).

В контроле через 24 ч после удаления БрдУ из среды инкубации появляются два типа ядер: ядра, в которых метка равномерно распределяется в объеме кариоплазмы (рис. 3, *b*), и ядра, в которых метка выявляется в виде дискретных флуоресцирующих областей (рис. 3, *b*). Зональное распределение меченой ДНК характерно для ядер клеток, прошедших два деления после удаления БрдУ из среды, а гомогенное распределение метки — для клеток, прошедших одно деление или не делившихся.

В клетках, обработанных 5-аза-С, метка распределяется в ядре преимущественно гомогенно, что свидетельствует о блокировании делений, но не о репликации ДНК.

Для проверки способности клеток проходить два последовательных раунда репликации в присутствии 5-аза-С БрдУ вводили на 2-е сут после начала инкубации с 5-аза-С. При таком протоколе в популяции выявляются гомогенно меченные ядра (индекс мечения — 87 %). Это означает, что в присутствии 5-аза-С клетки не утрачивают способности к репликации ДНК.

Включение метки спустя 24 ч после внесения 5-аза-С на фоне падения митотической активности позволяет предположить, что по крайней мере часть клеток становятся полиплоидными, на что указывает и увеличение размеров клеток, наблюдаемое в экспериментах (рис. 4, *a—b*). Для проверки была проведена сравнительная оценка количества ДНК в ядрах контрольных клеток и клеток, инкубированных в присутствии 5-аза-С в течение 24 и 48 ч. Увеличение интенсивности флуоресценции ядер обработанных клеток свидетельствует о появлении в популяции полиплоидных клеток (рис. 4, *c—e*).

Таким образом, проведенные предварительные эксперименты показали адекватность использованной нами модели для изучения структуры хромоцентров в условиях гипометилирования ДНК генома.

Инкубация клеток в присутствии 5-аза-С в течение 24 ч приводит к разрыхлению материала хромоцентров, однако наиболее отчетливо изменения в их морфологии выявляются спустя 48 ч после внесения реактива в среду культивирования (рис. 1, *b—c*).

По характеру окрашивания ДНК флуорохромом DAPI и антителами к белку HP1 $\alpha$  можно выделить два типа клеток, ядра которых различаются по организации хромати-



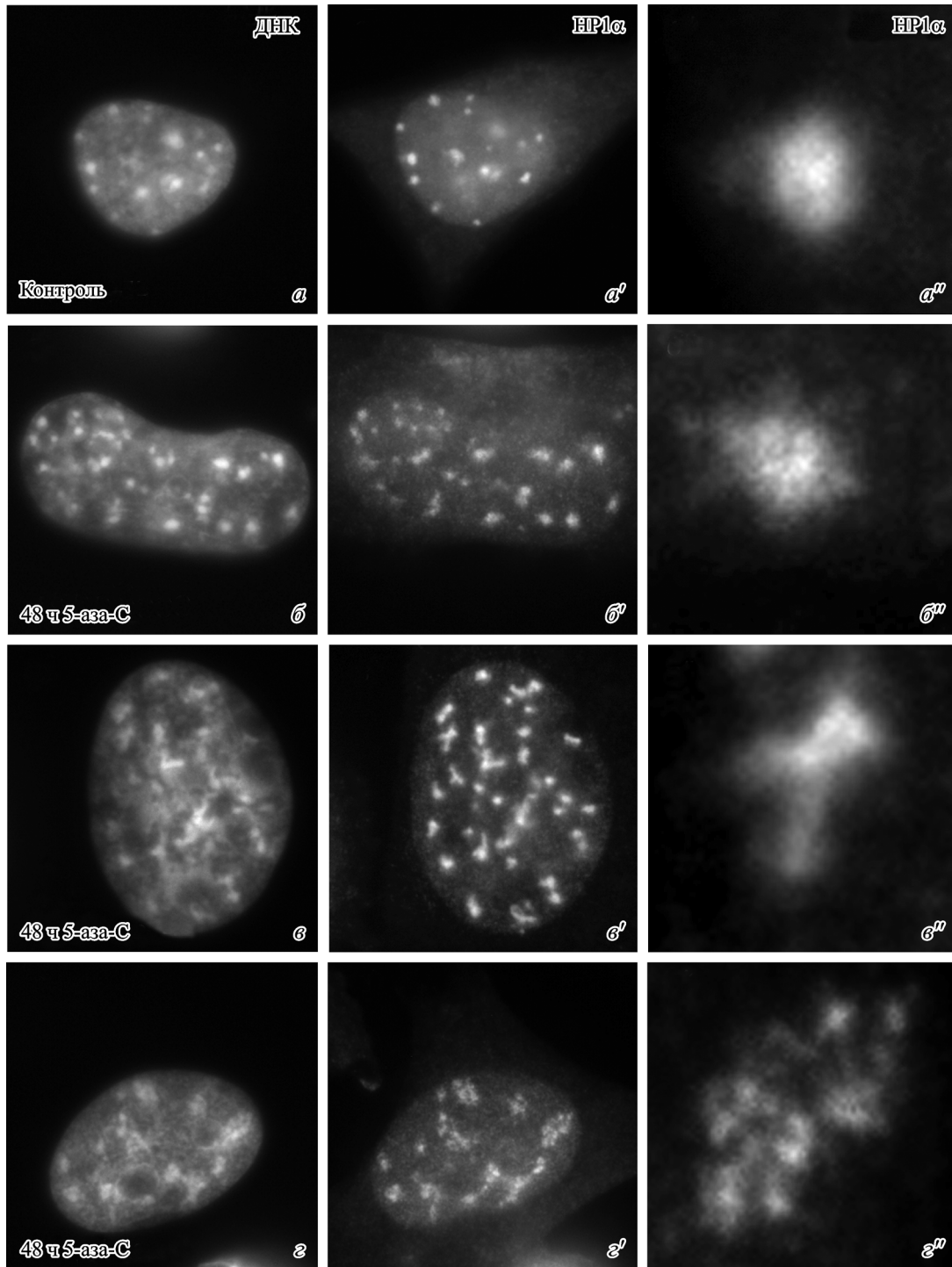


Рис. 1. Хромоцентры и распределение HP1α в клетках L929 в контроле и после инкубации с 5-азациитидином.

*a—a''* — контроль; *б—б''*, *г—г''* — характерные клеточные типы, выявляющиеся в популяции после 48 ч инкубации в присутствии 5-аза-С; *б—б''* — клетки с хромоцентрами, не претерпевшими изменений; *в—в''* — клетки с частично декомпактизированными (удлиненными) хромоцентрами; *г—г''* — клетки с дискретным распределением HP1α в хромоцентрах. *a—г* — окраска DAPI; *a'—г'* — окраска антителами против HP1α; *a—г'''* — увеличенные изображения отдельных хромоцентров при окраске антителами против HP1α. Об. 100×, вспомогательная линза 1.6×.

на (рис. 1). В ядрах части клеток (около 15 %) не наблюдается видимых изменений в структуре хроматина и хромоцентров по сравнению с контролем (рис. 1, б). В большей части клеток (около 85 %) форма и структура хромоцентров резко меняются: они декомпактизируются и приобретают вид тяжей (рис. 1, в). Иногда хромоцентры приобретают вид кластеров мелких глобул с неоднород-

ным в отличие от контрольных клеток распределением HP1α внутри DAPI-позитивной области (рис. 1, г). Эти изменения не затрагивают хроматина, который не входит в состав хромоцентров.

Изменение структурной организации хромоцентров после 2 сут инкубации клеток в присутствии 5-азациитидина подтверждается данными электронной микроскопии.



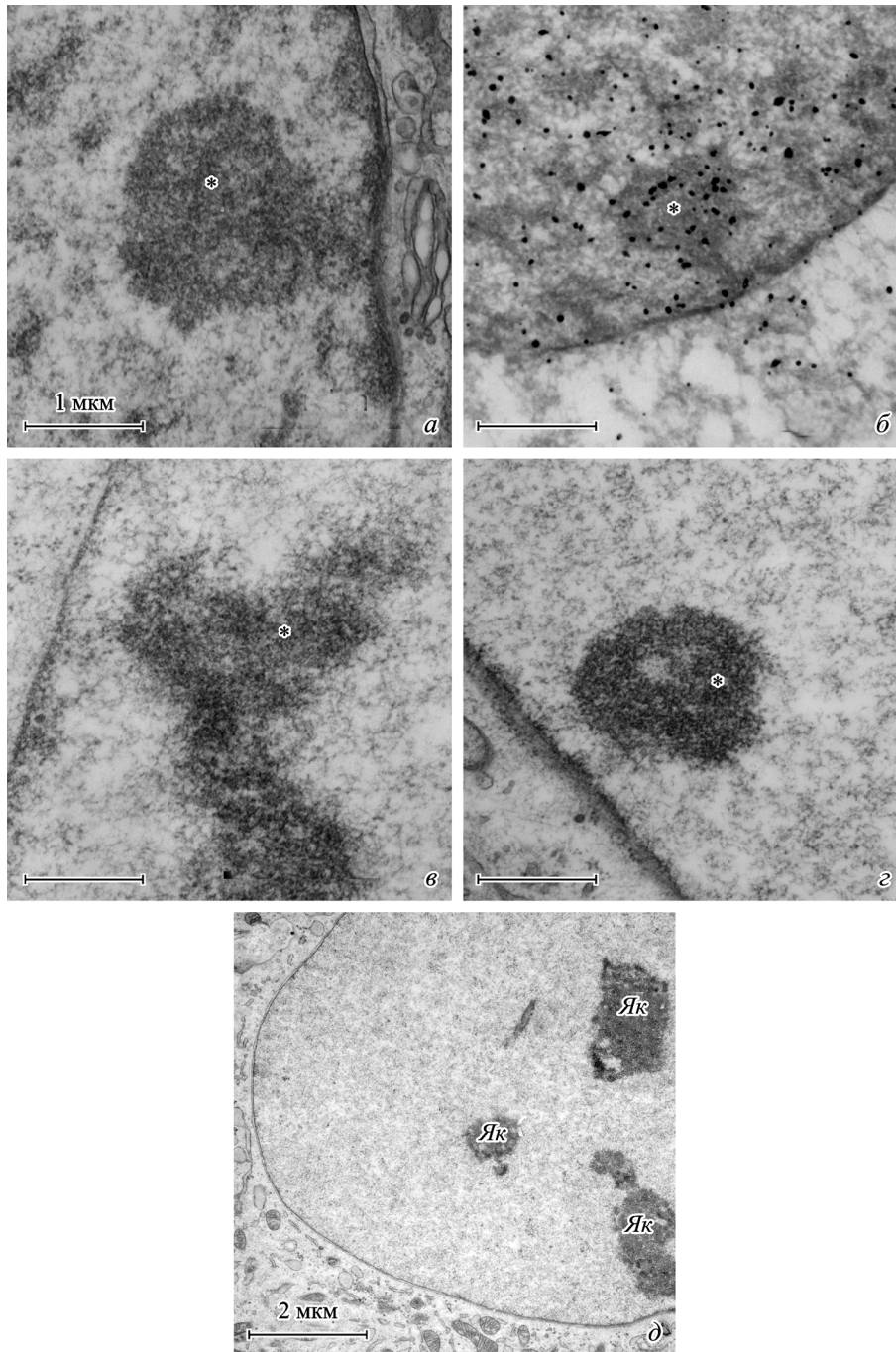


Рис. 2. Ультраструктура хромоцентров.

*a* — хромоцентр в ядре контрольной клетки; *б* — иммуноэлектронная визуализация NP1α в хроматине контрольных клеток; *в* — хромоцентр в ядре клетки, инкубированной 48 ч в присутствии 5-азациитидина; *г* — хромоцентр в ядре клетки, инкубированной 48 ч в присутствии трихостатина А; *д* — ядро клетки, не содержащее морфологически обособленных хромоцентров (инкубация с ТСА). *Як* — ядрышки, *звездочки* — хромоцентры.

На ультратонких срезах ядер хромоцентры имеют вид вытянутых тяжей, в которых выявляются дискретные зоны повышенной концентрации ДНП-фибрилл (рис. 2, *а*).

Инкубация клеток в присутствии ТСА в течение 48 ч приводит к появлению в популяции двух типов клеток, различающихся по структуре хроматина. В большинстве клеток (около 75 %) организация хроматина и хромоцентров не изменяется по сравнению с контролем. В таких клетках хромоцентры окрашиваются антителами к белку NP1α, однако интенсивность их флуоресценции резко падает (рис. 5, *б*). Ультраструктурный анализ не вы-

являет отличий от контроля в организации хромоцентров в таких клетках (рис. 2, *г*). В то же время слой периферического гетерохроматина в клетках, обработанных ТСА, истончается и представлен 2—3 слоями электронно-плотных гранул (рис. 2, *г*).

В клетках второго типа, составляющих 25 % популяции, большая часть хроматина, включая хромоцентры, переходит в диффузное состояние, и хромоцентры не выявляются при окрашивании АТ-специфичным красителем (DAPI). При этом продолжают выявляться небольшие блоки конденсированного материала на периферии ядра и

вблизи ядрышек. Размеры этих блоков существенно меньше размеров хромоцентров в интактных клетках (рис. 5, в). Ядра таких клеток слабо окрашиваются антителами против HP1 $\alpha$ . Блоки конденсированного материала декорируются антителами, что позволяет идентифицировать их как остаточные хромоцентры. Ультраструктурный анализ не позволяет надежно выявить эти зоны по морфологическим признакам (рис. 2, д).

Такая морфология хроматина и картина распределения HP1 $\alpha$  формируются через 24 ч инкубации клеток в присутствии ТСА. После удаления ингибитора из среды культивирования происходит восстановление состояния клеток, характерное для контроля (не иллюстрировано).

Искусственная декомпактизация хроматина в живых клетках представляет собой метод, позволяющий выявить «промежуточные» уровни компактизации ДНП-фибрилл, которые могут быть маскированы за счет высокой плотности упаковки материала в хромоцентрах. Вопрос об их существовании и организации является принципиальным для понимания роли метилирования ДНК и посттрансляционных модификаций гистонов в макромолекулярной организации гетерохроматина.

Для декомпактизации хроматина живые клетки (контрольные и подвергнутые воздействию 5-аза-С и ТСА) обрабатывали 30%-ным раствором Хенкса в течение 1 ч. Для проверки возможности структурной реконструкции блоков гетерохроматина клетки переводили в нормотоническую среду стандартного состава.

Гипотоническая обработка контрольных (интактных) клеток приводит к декомпактизации хромоцентров: компактные округлые хромоцентры (рис. 6, а) разрыхляются, принимая вид кластеров, состоящих из дискретных глобул и фибрилл (рис. 6, б). При помещении таких клеток в нормотоническую среду хромоцентры восстанавливают исходную компактную конформацию (рис. 6, в).

В клетках, подвергнутых гипотоническому воздействию после 48-часовой инкубации в присутствии 5-аза-С (рис. 6, з), хромоцентры приобретают сходную глобулярно-фибрилярную структуру (рис. 6, д). После переноса клеток в нормотоническую среду материал хромоцентров компактизируется в протяженные фибриллы (рис. 6, е).

Гипотоническое воздействие на клетки, инкубированные в течение 2 сут в присутствии ТСА, вызывает разворачивание большинства хромоцентров в замкнутые кольцевые структуры (рис. 6, з). Они могут быть как одиночными, так и собранными в крупные и мелкие тесно сближенные группы. В 20 % клеток хромоцентры перестают отчетливо выявляться на фоне прочего хроматина при окрашивании DAPI (не иллюстрировано). Эти клетки предположительно соответствуют той популяции, в которой хромоцентры полностью разрушаются под воздействием ТСА. Важно отметить, что в целом прочий хроматин таких клеток также демонстрирует «ячеистую» структуру (рис. 6, з). При переносе в изотоническую среду хромоцентры восстанавливают плотную упаковку спустя 60 мин. При этом прочий хроматин коллапсирует и в ядрах начинают выявляться пустоты и толстые протяженные DAPI-позитивные тяжи (рис. 6, и).

## Обсуждение

В настоящее время показано, что процесс инактивации транскрипции ДНК инициируется каскадом событий, в ходе которых осуществляются энзиматическая мо-

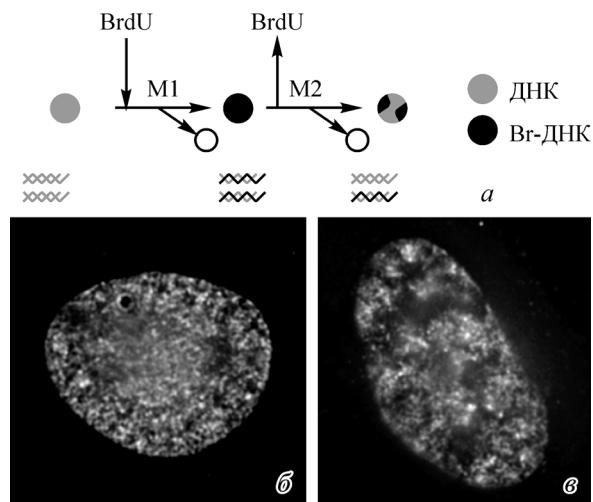


Рис. 3. Эксперимент для детектирования прохождения клетками двух последовательных митотических делений; окраска антителами против БрдУ.

а — схема сегрегации меченой БрдУ ДНК, приводящей к появлению ядер с зональным распределением репликационной метки; б — клетка, включавшая БрдУ в течение 24 ч, не делившаяся или прошедшая одно деление после удаления БрдУ из среды; в — клетка, прошедшая два последовательных митоза после удаления БрдУ из среды культивирования. Об. 100 $\times$ , вспомогательная линза 1.6 $\times$ .

дификация гистонов и формирование макромолекулярных комплексов, включающих в себя специфические белки, низкомолекулярные РНК и ряд других факторов (Huisinga et al., 2006). Ранее было принято считать, что специфическими маркерными компонентами, характеризующими инактивированный хроматин, помимо метилированной ДНК являются белки — гистон H3, метилированный по 9-му остатку лизина (H3K9me), и белок HP1 (Craig, 2004). Однако недавно получены данные, по которым оба белка (H3K9me и HP1) могут рекрутироваться в транскрибирующиеся области активных генов (Vakoc et al., 2005). В связи с этим особый интерес представляют вопросы о структурной организации активного и инактивированного хроматина и о роли метилирования ДНК и энзиматической модификации белков в создании и поддержании структуры инактивированного хроматина.

В настоящей работе изучена структурная организация блоков конститутивного гетерохроматина (хромоцентров) с использованием ингибиторного анализа и в условиях их искусственной декомпактизации *in vivo*. В качестве агента, деконденсирующего хроматин, использовали гипотоническую среду культивирования, для модуляции энзиматической модификации хроматина хромоцентров использовали 5-азацитидин — ингибитор ДНК-метилтрансферазы (Creusot et al., 1982) — и трихостатин А — ингибитор деацетилаз гистонов (Hoshikava et al., 1994; Yoshida et al., 1995).

Известно, что 5-азацитидин включается корепликативно в состав ДНК вместо цитозина. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что включение этого основания в состав ДНК в ходе репликации снижает общий уровень метилирования и может приводить к активации экспрессии ранее не активных генов (Castilho et al., 1999; Christman, 2002). Включение 5-азацитидина в состав молекулы ДНК также приводит к тому, что гетерохроматин, обычно реплицирующийся в поздней S-фазе, вступает в реплика-



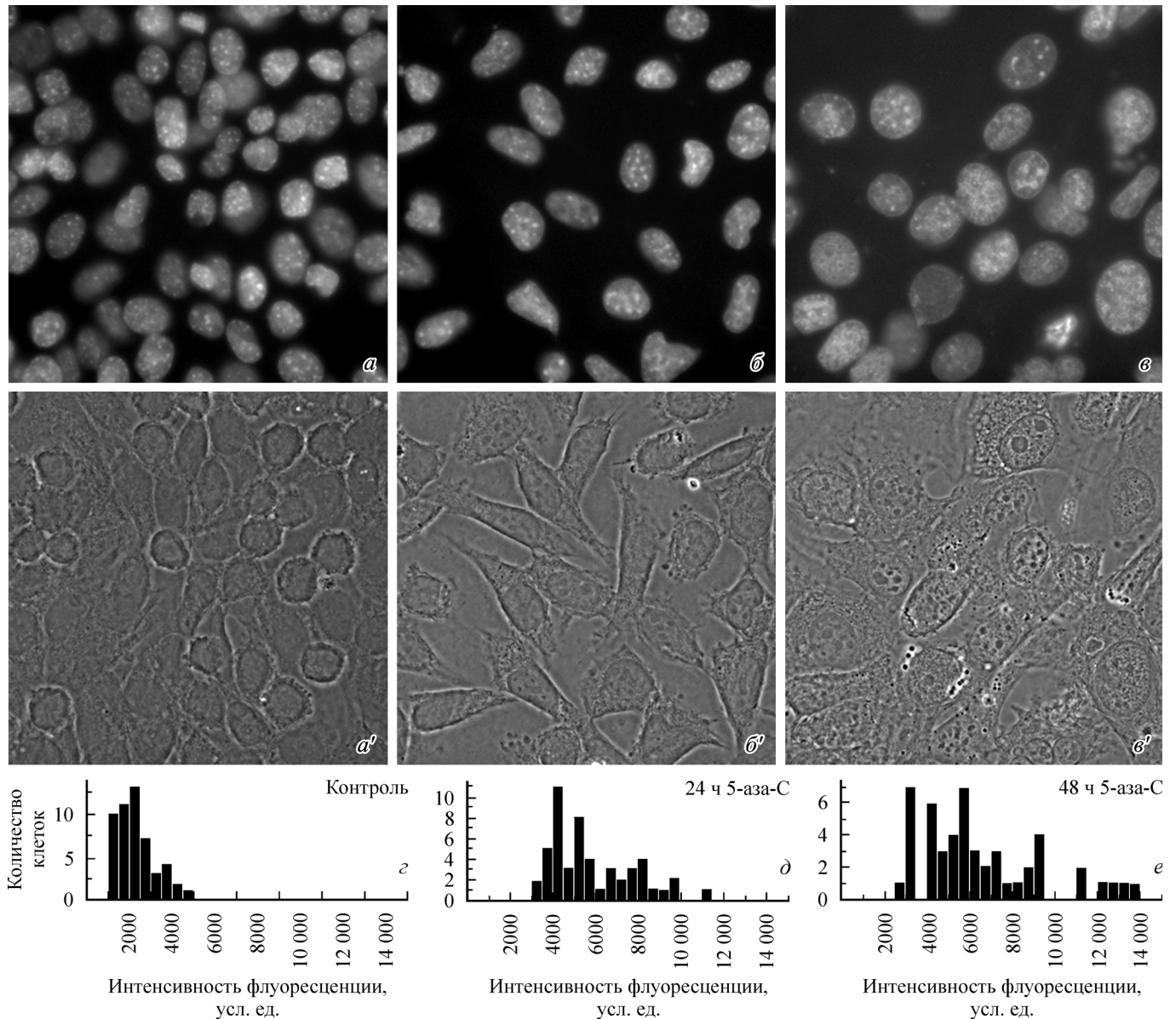


Рис. 4. Изменение размеров клеток и накопление ДНК в присутствии 5-аза-С.

*a, a'* — контроль; *b, b'* — 24 ч инкубации в присутствии 5-аза-С; *c, c'* — 48 ч инкубации в присутствии 5-аза-С. *a—c* — окраска DAPI; *a'—c'* — фазовый контраст. Об. 63×, вспомогательная линза 1.6×. *z—e* — спектры интенсивности флуоресценции DAPI в контроле (*z*) и в различные сроки инкубации в присутствии 5-аза-С: *d* — 24 ч инкубации, *e* — 48 ч инкубации. Выборка — 150 клеток на спектр.

цию раньше, чем в контрольных клетках, не обработанных 5-азацитидином (Bailis, Forsburg, 2003).

Полученные нами данные показывают, что деметилирование ДНК, опосредованное включением 5-аза-С, вызывает резкие изменения в макромолекулярной организации гетерохроматина в составе хромоцентров. Показано, что деметилирование ДНК приводит к существенным изменениям в позиционировании нуклеосом в локальных участках «элементарных» ДНП-фибрилл (Gilbert et al., 2007). Из полученных в настоящей работе данных следует, что уровень метилирования ДНК является фактором, определяющим структуру гетерохроматинизированных локусов хромосом не только на нуклеосомном, но и на высших уровнях компактизации хроматина.

Причины, по которым изменение уровня метилирования ДНК приводит к декомпактизации гетерохроматина

на макромолекулярном уровне, остаются неизвестными. Показано, что метильные группы на остатках цитозина являются сайтами, связывающими определенные белки, известные под собирательным названием MeCP (Boyes, Bird, 1992; Craig, 2004). Можно предположить, что некоторые из них выполняют функцию «скрепок», удерживающих ДНП-фибриллы в сближенном состоянии. Косвенно наличие таких «скрепок» показано в фотостабилизированном хроматине (Sheval et al., 2002). Резкое снижение количества метильных групп и соответственно белковых «скрепок» в гипометилированной ДНК может приводить к тому, что после репликации в присутствии 5-аза-С ДНК гетерохроматина теряет способность к компактизации до уровня хромоцентра.

Принципиально важно, что декомпактизирующее действие 5-аза-С достаточно специфично именно для



прицентромерного гетерохроматина и не распространяется на хроматин, не входящий в состав хромоцентров.

Метилирование ДНК происходит корепликационно, что является механизмом наследования сигналов репрессии транскрипции. Вторым процессом, управляющим активностью генов, является посттрансляционная модификация гистонов, осуществляемая после их включения в состав хроматина. В связи с этим большой интерес представляет совокупность фактов, свидетельствующих о том, что для нормального завершения процесса «созревания» хроматина после репликации ДНК необходимо деацетилирование гистонов.

Так, известно, что гистон Н4 входит в состав новосинтезированных нуклеосом, ацетилированных по нескольким положениям (Pegu et al., 1993a, 1993b). Также показано, что в присутствии другого известного ингибитора деацетилаз гистонов — бутирата натрия — «созревание» хроматина нарушается, в результате происходит накопление ацетилированных форм гистонов Н3 и Н4 (Vidali et al., 1978), а хроматин не восстанавливает нормальную чувствительность к нуклеазам (Annunziato, Seale, 1983).

Инкубация клеток в присутствии ТСА, как можно заключить по выявленной нами релокализации белка HP1α, приводит к недометилированию N-концевых доменов молекул гистона Н3. Этот факт подтверждает правомочность использования ТСА для анализа роли метилирования гистонов в организации гетерохроматина.

Представленные в работе данные позволяют заключить, что метилирование гистона Н3 по 9-му остатку лизина, формирующее сайт связывания для HP1α, играет определяющую роль в поддержании компактной структуры хромоцентров. Это наблюдение, однако, не противоречит результатам работы, в которой показано, что хромоцентры сохраняют пространственную обособленность и характерную морфологию в отсутствие накопления в них HP1α (Mateos-Langerak et al., 2007), и согласуется с данными о том, что одним из ведущих факторов гетерохроматинизации является работа метилтрансферазы SUV39H1, ответственной за метилирование гистона Н3 (Vaquero et al., 2007).

Считается, что метилирование ДНК является завершающим этапом гетерохроматинизации ДНК, в то время как метилирование гистона Н3 и связывание HP1α представляют собой промежуточную стадию этого процесса (Smallwood et al., 2007). Нами показано, что гиперацетилирование гистонов приводит к декомпактизации не связанных с хромоцентрами блоков конденсированного хроматина. Этот результат полностью согласуется с данными цитированной работы.

В ранних работах на модели пермеабелизированных клеток показано, что в прицентромерном районе митотических хромосом мыши отсутствуют высшие уровни компактизации ДНК и хроматин представлен плотно упакованными нуклеосомными фибриллами (Фролова и др., 1989).

В соответствии с этими данными светооптический и электронно-микроскопический анализ демонстрирует однородную и компактную упаковку ДНП-фибрилл в хромоцентрах, обогащенных сателлитной ДНК. Однако проведенные нами эксперименты по искусственной декомпактизации хроматина в живых клетках показали, что ДНК в составе хромоцентров имеет несколько уровней иерархической организации.

Известно, что в условиях гипотонии все компартменты интерфазного ядра, включая хроматин и ядрышки, а

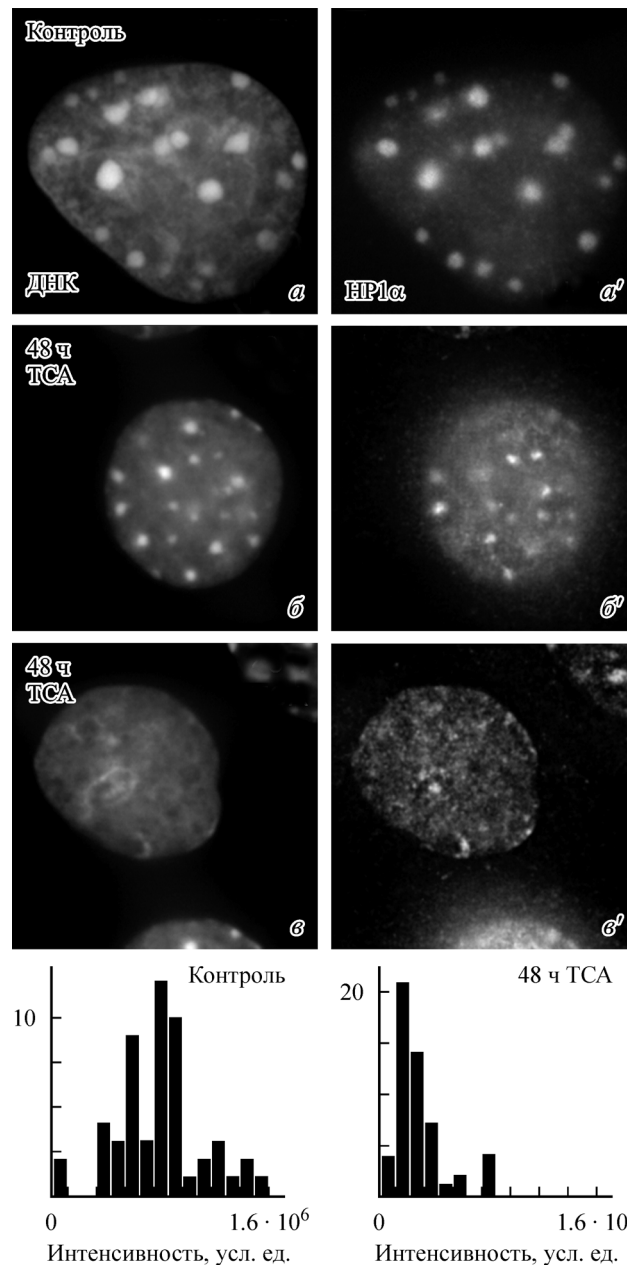


Рис. 5. Хромоцентры и распределение HP1α в контроле и при инкубации с ТСА.

*a, a'* — контроль; *б, б', в, в'* — клетка после 48 ч инкубации в присутствии ТСА; *г, д* — спектры интенсивности окрашивания клеток антителами против HP1α в контроле и после 48 ч инкубации с ТСА (выборка — 50 клеток на спектр). *a–в* — окраска DAPI; *a'–в'* — окраска антителами против HP1α. Об. 100×, вспомогательная линза 1.6×.

также хромосомы митотических клеток, декомпактизируются (Зацепина и др., 1982; Киреев и др., 1990). Возвращение клеток в нормотоничную среду приводит к поэтапной структурной «реконструкции» ядер. При этом в составе хроматина выявляются «промежуточные» уровни компактизации ДНК — хрономемы и элементарные хромомеры (Поляков и др., 2006). Можно предполагать, что этим структурам соответствуют наблюдаемые в частично декомпактизированных хромоцентрах глобулы и фибриллы.

Вопрос о возможной артефактности этих структурных комплексов снимается по двум причинам. Во-пер-

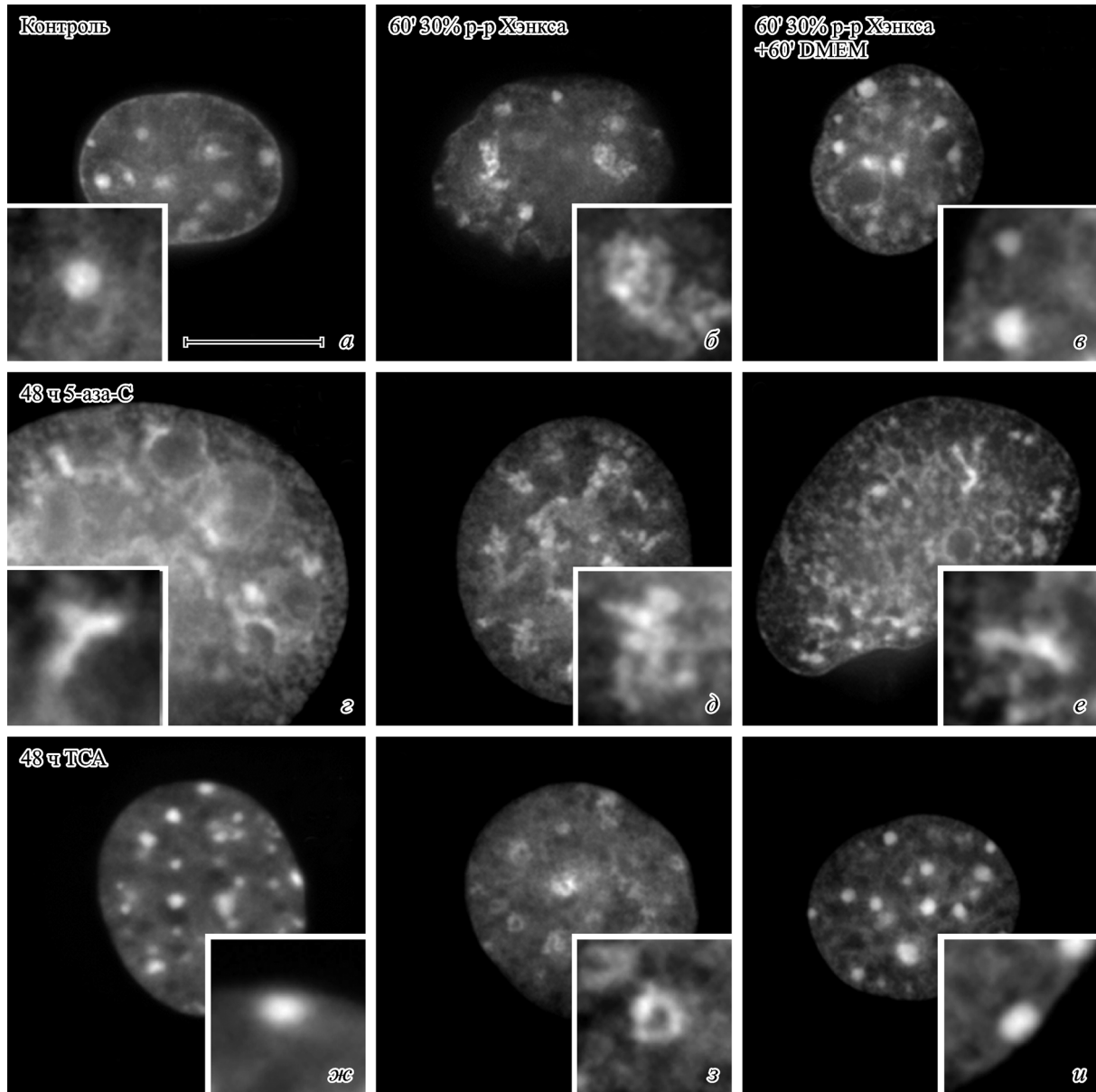


Рис. 6. Декомпактизация интактного и модифицированного хроматина в гипотонической среде и структурная реконструкция при последующем переводе в нормальные условия культивирования.

*a–в* — клетки с интактным хроматином (*a* — контроль, *б* — в гипотонической среде, *в* — после переноса из гипотонической в нормотоническую среду); *г–е* — клетка, обработанная 5-аза-С (*г* — контроль, *д* — в гипотонической среде, *е* — после переноса из гипотонической в нормотоническую среду); *ж–и* — клетка, обработанная трихостатином А (*ж* — контроль, *з* — в гипотонической среде, *и* — после переноса из гипотонической в нормотоническую среду). На *врезках* — увеличенные изображения индивидуальных хромоцентров. Окраска DAPI. Об. 100×, вспомогательная линза 1.6×.

вых, идентичные структуры можно наблюдать в составе хромоцентров после инкубации клеток с 5-аза-С, без использования гипотонического воздействия. В этом случае мы имеем совершенно другой механизм декомпактизации, никак не связанный с изменением состава внутриклеточной среды. Во-вторых, после искусственной декомпактизации хромоцентры полностью восстанавливают исходную структуру.

Еще более отчетливо фибриллярная структура хроматина после гипотонической обработки выявляется в клетках, инкубированных в присутствии ТСА. Кольцевая конформация ДНП-фибриллы в этих условиях может предположительно обуславливаться избыточным отрицательным зарядом ДНП, возникшим за счет гиперацетилирования гистонов (Vidali et al., 1978). Отсутствие этого

электростатического эффекта в клетках, не подвергнутых гипотонической обработке, может объясняться наличием чувствительных к изменению ионных условий «скрепочных белков» (Поляков и др., 2006) и(или) компенсацией отрицательных зарядов одно- и двухвалентными катионами (Amchenkova et al., 1998).

Нетривиальная кольцевая конформация развернутых хромоцентров может определяться взаимодействием белковых комплексов, рекрутированных на локусах, фланкирующих блоки сателлитной ДНК. Такие последовательности и ассоциированные с ними белки обнаружены у дрожжей (Meneghini et al., 2003; Scott et al., 2006). Их присутствие блокирует распространение гетерохроматинового микроокружения вдоль хромосомы. Нельзя исключить, что функционирование подобного рода комплексов и их

локализация определяются не только специфическими последовательностями, но и уровнем метилирования ДНК, который для сателлитной ДНК — основного компонента прицентромерного гетерохроматина — во много раз превышает уровень метилирования тотального хроматина (Salomon et al., 1969; Selig et al., 1988; Grunau et al., 2006).

Вся совокупность полученных данных свидетельствует о том, что следующим за «компактным хромоцентром» уровнем компактизации прицентромерного гетерохроматина в интерфазном ядре является фибрилла диаметром 100—200 нм или тандемно расположенные глобулярные образования того же диаметра, устойчивые к гипотоническому воздействию. Механизмы, поддерживающие этот уровень, предположительно соответствующий хромоному (Tumbar et al., 1999), остаются неизвестными.

Авторы выражают благодарность А. В. Лазареву и Е. П. Сенченкову за помощь в работе с электронными микроскопами и за поддержку работоспособности приборов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-49560).

#### Список литературы

- Зацепина О. В., Поляков В. Ю., Ченцов Ю. С. 1982. Формирование ядерной оболочки вокруг метафазных хромосом в гипотонической среде. Цитология. 24 (1) : 5—10.
- Киреев И. И., Зацепина О. В., Поляков В. Ю., Ченцов Ю. С. 1990. Динамика структурной реконструкции митотических хромосом после деконденсации *in vitro*. Цитология. 32 (5) : 449—454.
- Поляков В. Ю., Зацепина О. В., Киреев И. И., Прусов А. Н., Фаус Д., Шеваль Е. В., Коблякова Ю. В., Гольшев С. А., Ченцов Ю. С. 2006. Структурно-функциональная модель митотической хромосомы. Биохимия. 71 : 6—16.
- Прокофьева-Бельговская А. А. 1986. Гетерохроматические районы хромосом. М.: Наука. 431 с.
- Фролова Е. И., Зацепина О. В., Поляков В. Ю., Ченцов Ю. С. 1989. Особенности структурной организации прицентромерного гетерохроматина мыши, выявляемые в процессе дифференциальной деконденсации хромосом. Цитология. 31 (4) : 380—385.
- Amchenkova A. A., Buzhurina I. M., Gorgidze L. A., Kireyev I. V., Panov M. A., Polyakov V. J. 1998. The role of Ca ions in restoration of the structure of interphase and mitotic chromosomes in PK living cells after hypotonic stress. Cell Biol. Int. 22 : 509—515.
- Annunziato A. T., Seale R. L. 1983. Histone deacetylation is required for the maturation of newly replicated chromatin. J. Biol. Chem. 258 : 12 675—12 684.
- Bailis J. M., Forsburg S. L. 2003. It's all in the timing: linking S phase to chromatin structure and chromosome dynamics. Cell Cycle. 2 : 303—306.
- Boyes J., Bird A. 1992. Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. EMBO J. 11 : 327—333.
- Castilho A., Neves N., Rufini-Castiglione M., Viegas W., Heslop-Harrison J. S. 1999. Methylcytosine distribution and genome organization in triticale before and after treatment with 5-azacytidine. J. Cell Sci. 112 : 4397—4404.
- Christman J. K. 2002. S-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. Oncogene. 21 : 5483—5495.
- Craig J. M. 2004. Heterochromatin — many flavours, common themes. Bioessays. 27 : 17—28.
- Creusot F., Acs G., Christman J. K. 1982. Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine. J. Biol. Chem. 357 : 2041—2048.
- Eissenberg J. C., Elgin S. C. 2000. The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. Curr. Opin. Genet. Develop. 10 : 204—210.
- Fuks F. 2005. DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. Curr. Opin. Genet. Develop. 15 : 490—495.
- Gilbert N., Thomson I., Boyle S., Allan J., Ramsahoye B., Bickmore W. A. 2007. DNA methylation affects nuclear organization, histone modifications, and linker histone binding but not chromatin compaction. JCB. 177 : 401—411.
- Gilerovitch H. G., Bishop G. A., King J. S., Burry R. W. 1995. The use of electron microscopic immunocytochemistry with silver-enhanced 1.4-nm gold particles to localize GAD in the cerebellar nuclei. J. Histochem. Cytochem. 43 : 337—343.
- Goto T., Monk M. 1998. Regulation of X-chromosome inactivation in development in mice and humans. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62 : 362—378.
- Grunau C., Buard J., Brun M. E., De Sario A. 2006. Mapping of the juxtacentromeric heterochromatin-euchromatin frontier of human chromosome 21. Genome Res. 16 : 1198—1207.
- Hoshikawa Y., Kwon H. J., Yoshida M., Horinouchi S., Bep-pu T. 1994. Trichostatin A induces morphological changes and gel-solin expression by inhibiting histone deacetylase in human carcinoma cell lines. Exp. Cell Res. 214 : 189—197.
- Jeppesen P., Mitchell A., Truner B., Perry P. 1992. Antibodies to defined histone epitopes reveal variations in chromatin conformation and underacetylation of centric heterochromatin in human metaphase chromosomes. Chromosoma. 101 : 322—332.
- Mateos-Langerak J., Brink M. C., Luijsterburg M. S., van der Kraan I., van Driel R., Verschure P. J. 2007. Pericentromeric heterochromatin domains are maintained without accumulation of HP1. Mol. Biol. Cell. 18 : 1464—1471.
- Meneghini M. D., Wu M., Madhani H. D. 2003. Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. Ctl. 112 : 725—736.
- Metzger E., Wissmann M., Yin N., Muller J. M., Schneider R., Peters A. H., Gunther T., Buettner R., Schule R. 2005. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. Nature. 437 : 436—439.
- Perry C. A., Allis C. D., Annunziato A. T. 1993a. Parental nucleosomes segregated to newly replicated chromatin are underacetylated relative to those assembled *de novo*. Biochemistry. 32 : 13 615—13 623.
- Perry C. A., Dadd C. A., Allis C. D., Annunziato A. T. 1993b. Analysis of nucleosome assembly and histone exchange using antibodies specific for acetylated H4. Biochemistry. 32 : 13 605—13 614.
- Peters A. H., O'Carroll D., Scherthan H., Mechtler K., Sauer S., Schofer C., Weipoltshammer K., Pagani M., Lachner M., Kohlmaier A., Opravil S., Doyle M., Sibilia M., Jenuwein T. 2001. Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. Cell. 107 : 323—337.
- Rea S., Eisenhaber F., O'Carroll D., Strahl B. D., Sun Z. W., Schmid M., Opravil S., Mechtler K., Ponting C. P., Allis C. D., Jenuwein T. 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. Nature. 406 : 593—599.
- Reynolds E. C. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17 : 208—213.
- Salomon R., Kaye A. M., Herzberg M. 1969. Mouse nuclear satellite DNA: 5-methylcytosine content, pyrimidine isoplith distribution and electron microscopic appearance. J. Mol. Biol. 43 : 581—592.
- Scott K. C., Merrett S. L., Willard H. F. 2006. A heterochromatin barrier partitions the fission yeast centromere into discrete chromatin domains. Curr. Biol. 16 : 119—129.



Selig S., Ariel M., Goitein R., Marcus M., Cedar H. 1988. Regulation of mouse satellite DNA replication time. *EMBO J.* 7 : 419—426.

Sheval E. V., Prusov A. N., Kireev I. I., Fais D., Polyakov V. Y. 2002. Organization of higher-level chromatin structures (chromomere, chromonema and chromatin block) examined using visible light-induced chromatin photo-stabilization. *Cell Biol. Int.* 26 : 579—591.

Smallwood A., Esteve P. O., Pradhan S., Carey M. 2007. Functional cooperation between HP1 and DNMT1 mediated gene silencing. *Genes Develop.* 21 : 1169—1178.

Sun F. L., Cuaycong M. H., Elgin S. C. 2001. Long-range nucleosome ordering is associated with gene silencing in *Drosophila melanogaster* pericentric heterochromatin. *Mol. Cell. Biol.* 21 : 2867—2879.

Taddei A., Maison C., Roche D., Almouzni G. 2001. Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases. *Nat. Cell Biol.* 3 : 114—120.

Tumbar T., Sudlow G., Belmont A. S. 1999. Large-scale chromatin unfolding and remodeling induced by VP16 acidic activation domain. *J. Cell Biol.* 145 : 2241—2254.

Vaquero A., Scher M., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Serrano L., Reinberg D. 2007. SIRT1 regulates the histone methyl-transferase SUV39H1 during heterochromatin formation. *Nature.* 450 : 440—444.

Vidali G., Boffa L. C., Bradbury E. M., Allfrey V. G. 1978. Butyrate suppression of histone deacetylation leads to accumulation of multiacetylated forms of histones H3 and H4 and increased DNase I sensitivity of the associated DNA sequences. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 75 : 2239—2243.

Yoshida M., Horinouchi S., Beppu T. 1995. Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function. *Bioessays.* 17 : 423—430.

Поступила 5 II 2008

#### THE ROLE OF DNA METHYLATION AND HISTONE MODIFICATIONS IN STRUCTURAL MAINTAINANCE OF HETEROCHROMATIN DOMAINS (CHROMOCENTERS)

S. A. Golyshev,<sup>1</sup> P. N. Vichreva, E. V. Sheval, G. I. Kiryanov, V. Yu. Polyakov

A. N. Belozerski Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University;

<sup>1</sup> e-mail:sergei.golyshev@mail.genebee.msu.ru

The effects of DNA methylation inhibitor 5-azacytidine (5-aza-C) and histone acetylation inhibitor trichostatin A (TSA) on the structure of pericentric heterochromatin in cultured mouse cells (L929) has been studied. After 48 h of 5-aza-C treatment, about 85 % of the cells demonstrate transformation of chromocenters from ovoid to elongated structures. Hypotonic treatment of these cells reveals tandemly arranged DAPI-positive globules, well distinguishable by light microscopy. The same globular units can be revealed in hypotonic-treated control cells. 48 h of TSA treatment causes dramatic decrease in HP1 $\alpha$  content in the cells. Chromocenters in 25 % of treated cells became highly decondensed and can not be reliably detected by light and electron microscopy. 85 % of cells demonstrate globular chromocenters with low HP1 $\alpha$  content. Hypotonic treatment causes transformation of compact chromocenters into ring-like structures, which can be either single or clustered. Rings are formed by uniform fiber, in which no globular subunits are detected. The data obtained are discussed concerning several mechanisms of heterochromatin structure maintenance and the roles of epigenetic marks in them.

**Key words:** heterochromatin, chromocenter, DNA methylation, histone methylation, histone acetylation, chromatin structure, inhibition analysis.